

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Identification et étude de partenaires pour les protéines Maged

Burlon, Vanessa

Award date:
2004

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joëlle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Identification et étude de partenaires pour les protéines Maged

BURLON Vanessa

Résumé

Le génome de la souris contient 30 gènes *Mage* et celui de l'homme 55. Ces gènes peuvent être répartis en deux catégories, en fonction de leur profil d'expression. Chez le mâle, les gènes *Mage* de type I ne sont exprimés que dans la lignée germinale (testicules). Chez la femelle, l'expression de ces gènes est limitée au placenta. Des tumeurs cancéreuses de divers types histologiques expriment aussi certains de ces gènes. Les gènes *Mage* de type II sont au contraire exprimés dans de nombreux tissus normaux autres que le testicule et le placenta. Les gènes *Maged1* et *Maged2*, sur lesquels nous avons travaillé, font partie de cette seconde catégorie.

Un des partenaires connu de *Maged1* est le récepteur aux neurotrophines p75NTR. Nous avons utilisé la méthode du double-hybride dans la levure pour tester une éventuelle interaction entre p75NTR et *Maged2*. Les résultats obtenus suggèrent mais ne démontrent pas l'existence d'une telle interaction. Un autre objectif de notre travail était d'identifier de nouveaux partenaires de *Maged1* et de *Maged2*. Un crible double-hybride d'une bibliothèque d'ADNc nous a permis de détecter une interaction entre *Maged2* et la protéine Gs α . Cette interaction a été confirmée in vitro par co-immunoprécipitation de produits obtenus par transcription-traduction in vitro. La signification fonctionnelle de cette interaction reste à explorer.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2004

Promoteur: O. De Backer

Je tiens à remercier tout particulièrement :

Monsieur Olivier De Backer, mon promoteur, qui m'a accueillie dans son équipe, dirigée tout au long de mon travail en laboratoire et suivie dans l'élaboration de mon mémoire.

Madame Christiane Sterpin, ma tutrice, qui m'a particulièrement bien guidée dans les manipulations de laboratoire. Sa grande disponibilité m'a beaucoup aidée à mener à bien les diverses expériences.

Madame Catherine Lambert de Rouvroit, ma co-promotrice, qui m'a conseillée et apporté son expérience pour la rédaction de ce mémoire.

Madame Dominique Desnoeck-Verbois, pour son travail de séquençage, indispensable dans la réalisation de différentes expériences.

Mathieu, Carlos, Vanessa et Marie pour leur gentillesse et leur bonne humeur qui m'ont permis de travailler dans une ambiance chaleureuse et décontractée.

Marie-France, pour la dactylographie et la mise en page de mon mémoire.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	4
1. LES GÈNES MAGE	4
1.1 <i>Généralités</i>	4
1.2 <i>Les gènes MAGE de type I</i>	7
1.2.1. Les gènes MAGEA	7
1.2.2. Les gènes MAGEB.....	7
1.3 <i>Les gènes MAGE de type II</i>	7
1.3.1. Le gène Necdin.....	8
1.3.2. Les gènes MAGED	8
1.3.2.1. MAGED1	10
1.3.2.2. MAGED2	11
2. RECHERCHE DE PARTENAIRES DE MAGED1 ET MAGED2	11
2.1 <i>Le double-hybride</i>	11
2.2 <i>Les partenaires de Maged1</i>	12
2.2.1. p75NTR	12
2.2.2. Dlx 5 / Msx 2.....	14
2.2.3. Praja 1	14
2.2.4. IAP	14
2.2.5. Ror 2	15
2.2.6. UNC5H1	15
2.2.7. LRP1, un partenaire potentiel de Maged1	16
2.3 <i>Les partenaires de Maged2</i>	17
2.3.1. Gsα, un partenaire potentiel de Maged2.....	17
3. OBJECTIFS DU MÉMOIRE	18
RESULTATS ET DISCUSSION	19
1. ETUDE DES INTERACTIONS PHYSIQUES ENTRE MAGED1 ET p75NTR ET ENTRE MAGED2 ET p75NTR.....	19
1.1 <i>Construction de pACT2-d1, pACT2-d2 et pGBT9-p75</i>	19
1.1.1. Clonage des inserts dans pCRII.....	19
1.1.2. Clonage des inserts dans pACT2 et pGBT9	22
1.2 <i>Test d'interaction double-hybride dans la levure</i>	22
1.3 <i>Discussion et perspectives</i>	25
2. RECHERCHE DE PARTENAIRES DE MAGED1	27
2.1 <i>Crible d'une banque double-hybride</i>	27
2.2 <i>Vérification de l'interaction entre Maged1 et LRP1 par double-hybride</i>	29
2.2.1. Construction de pACT2-LRP1	29
2.2.2. Test d'interaction double-hybride dans la levure	29
2.3 <i>Discussion et perspectives</i>	30
3. RECHERCHE DE PARTENAIRES DE MAGED2	31

3.1	<i>Crible d'une banque double-hybride</i>	31
3.2	<i>Confirmation de l'interaction entre Maged2 et Gsα en double-hybride</i>	31
3.3	<i>Confirmation de l'interaction entre Maged2 et Gsα in vitro</i>	33
3.4	<i>Confirmation de l'interaction entre Maged2 et Gsα in vivo</i> ...	36
3.5	<i>Discussion et perspectives</i>	37
4.	CONCLUSION	38
	MATERIEL ET METHODES	39
1.	DOUBLE-HYBRIDE	39
1.1	<i>Construction de pACT2-d1/d2, pGBT9-p75, pACT2-LRP1</i>	39
1.1.1.	Insertion de Maged1, Maged2, p75NTR et LRP1 dans pCRII	39
1.1.1.1.	PCR sur DNA	39
1.1.1.2.	Clonage dans pCRII	39
1.1.1.3.	Isolation des clones d'intérêt par PCR.....	39
1.1.1.4.	Mini préparation d'ADN plasmidique	40
1.1.1.5.	Séquençage	40
1.1.2.	Insertion de d1, d2 et LRP1 dans pACT2 et de p75 dans pGBT9	41
1.1.2.1.	Récupération des inserts et linéarisation des plasmides	41
1.1.2.2.	Ligation de d1, d2 et LRP1 dans pACT2 et de p75 dans pGBT9	42
1.1.2.3.	Transformation de la ligation dans les bactéries	42
1.1.2.4.	Détection des clones d'intérêt par PCR	42
1.1.2.5.	Mini préparation d'ADN plasmidique	43
1.1.2.6.	Séquençage	43
1.2	<i>Transformation de la levure</i>	43
1.3	<i>Mise en évidence de l'activité β-galactosidase</i>	44
1.3.1.	En coulant l'X-gal sur boîte	44
1.3.2.	En utilisant l'ONPG comme substrat	44
1.3.3.	En utilisant le CPRG comme substrat	45
2.	CO-IMMUNOPRÉCIPITATION À PARTIR DE PROTÉINES PRODUITES PAR TNT	45
2.1	<i>Construction de pcDNA3/myc-His-gnas</i>	45
2.2	<i>Transcription-traduction in vitro</i>	47
2.3	<i>SDS-PAGE</i>	47
2.4	<i>Co-Immunoprécipitation</i>	47
3.	TRANSFECTION DE CELLULES COS	48
3.1	<i>Transfection des cellules</i>	48
3.2	<i>Western blot sur lysat</i>	48

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

1. Les gènes *MAGE*

1.1 Généralités

Le premier gène *MAGE* fut identifié en 1991, comme le gène encodant un antigène reconnu sur une lignée cellulaire de mélanome par un clone de lymphocytes T cytotoxiques (CTLs). Ce gène a été appelé *MAGE1*, pour Melanoma Antigen Encoding Gene 1.

Par après, d'autres gènes *MAGE* ont été identifiés, produisant eux aussi des peptides antigéniques liés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et présentés à la surface des cellules cancéreuses.

En utilisant *MAGE1* comme sonde dans des expériences d'hybridation, on s'est rendu compte qu'il appartenait à une famille de 12 gènes appelés *MAGEA*.

Ce cluster de gènes était situé sur le chromosome X et plus précisément sur la région q28 (De Plaen et al, 1994).

A suivi la découverte d'un autre cluster de 4 gènes situés en Xp21, appelés *MAGEB*. Les gènes *MAGEC*, situés en Xq26-27, ont ensuite été identifiés.

Ces gènes sont silencieux dans les tissus normaux, excepté dans les cellules de la lignée germinale mâle et, pour certains, dans le placenta. Ils sont exprimés dans des cellules tumorales de différents types histologiques où ils spécifient l'apparition d'antigènes reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques (CTLs). Ils constituent donc des cibles intéressantes pour l'immunothérapie contre le cancer, par vaccination des patients avec l'antigène. Les cellules de la lignée germinale mâle n'exprimant pas de molécules du CMH à leur surface, il ne risque pas d'y avoir d'effet dans les testicules. Ainsi, des réductions de tumeurs ont été observées chez des patients atteints du cancer par immunisation contre l'antigène codé par *hMAGEA3* (Marchand et al, 1999).

La principale phase ouverte de lecture de ces gènes *MAGE* se situe dans le dernier exon et code pour une protéine de ~ 300 acides aminés.

Récemment, une quatrième famille de gènes *MAGE*, localisés en Xp11.23, a été découverte. Ce sont les gènes *MAGED*, qui diffèrent des autres gènes *MAGE*. En effet, ils sont exprimés dans les tissus normaux et codent pour une protéine de ~ 600 acides aminés. Leur structure est également différente de celle des gènes *MAGEA*, *B* et *C* (Lucas et al, 1999).

En comparant les séquences de toutes les protéines *MAGE*, il a été montré qu'elles contenaient une région partagée de ~ 200 acides aminés, nommée « MAGE conserved domain » (MCD). Ce domaine est la seule région commune à tous les membres de la famille des gènes *MAGE*, le reste des séquences étant complètement différent d'une

sous-famille à l'autre (Fig. 1)

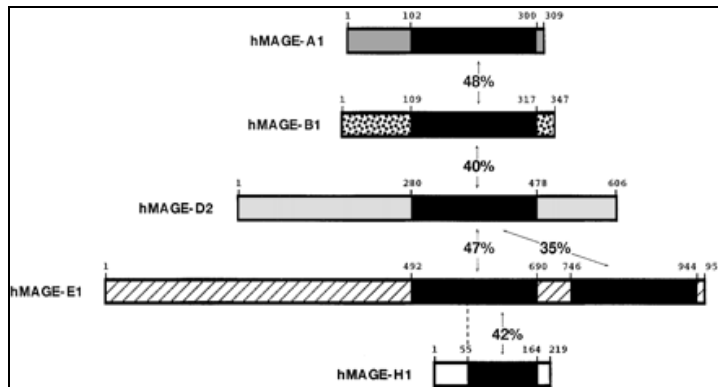


Fig. 1 : Représentation schématique des protéines hMAGEA1, B1, D2, E1, et H1
La zone noire correspond au MCD.

Les gènes *MAGE* ont été divisés en 2 catégories, selon leur profil d'expression :

- les gènes *MAGE* de type I, exprimés dans les tumeurs et non dans les tissus normaux excepté les cellules de la lignée germinale mâle et parfois celles du placenta,
- les gènes *MAGE* de type II, exprimés dans les tissus normaux.

L'ensemble des gènes *MAGE* humains peut être divisé en 13 sous-familles, dont 9 sont situées sur le chromosome X, 3 sur le chromosome 15 et 1 sur le chromosome 3 (Fig. 2) (Chomez et al, 2001).

Leurs orthologues chez la souris sont présentés au tableau 1.

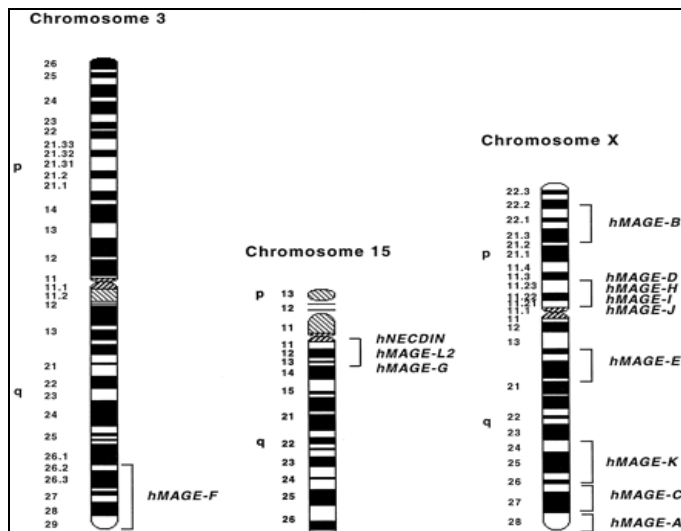


Fig. 2 : Localisation chromosomique des gènes MAGE humains

Tableau 1 : Membres humains et murins de la famille des gènes MAGE

Le profil d'expression est représenté par : P, probablement pseudogène

T, exprimé spécifiquement dans les cellules germinales et/ou les tumeurs

N, exprimé dans les tissus normaux adultes

ND, non déterminé

Subfamily	Human			Mouse		
	Gene name	Reference/Accession no. ^a	Expression ^b	Gene name	Reference/Accession no. ^a	Expression ^b
MAGE-A ^c	<i>hMAGE-A1</i>	Ref. 2	T	<i>mMage-a1</i>	Ref.14	ND
	<i>hMAGE-A2</i>		T	<i>mMage-a2</i>		T
	<i>hMAGE-A3</i>		T	<i>mMage-a3</i>		T
	<i>hMAGE-A4</i>		T	<i>mMage-a4</i>		T
	<i>hMAGE-A5</i>		T	<i>mMage-a5</i>		T
	<i>hMAGE-A6</i>		T	<i>mMage-a6</i>		ND
	<i>hMAGE-A7</i>		P	<i>mMage-a7</i>		P
	<i>hMAGE-A8</i>		T	<i>mMage-a8</i>		T
	<i>hMAGE-A9</i>		T	<i>mMage-a9</i>		P
	<i>hMAGE-A10</i>		T		AL021127.2 ₍₉₄₅₈₋₁₀₁₈₉₎	
	<i>hMAGE-A11</i>		T			
	<i>hMAGE-A12</i>		T			
	<i>hMAGE-A13</i>		P			
	<i>hMAGE-A14</i>		P			
	<i>hMAGE-A15</i>		P ^d			
MAGE-B ^c	<i>hMAGE-B1</i>	Ref. 5	T	<i>mMage-b1</i>	Ref.15	T
	<i>hMAGE-B2</i>		T	<i>mMage-b2</i>		T
	<i>hMAGE-B3</i>		T	<i>mMage-b3</i>		T
	<i>hMAGE-B4</i>		T	<i>mMage-b4</i>		T
	<i>hMAGE-B5</i>		T	<i>mMage-b5</i>		T
	<i>hMAGE-B6</i>	Ref. 8	T	<i>mMage-b6</i>	Ref.16	ND
	<i>hMAGE-B7</i>		P	<i>mMage-b7</i>		ND
	<i>hMAGE-B8</i>		P	<i>mMage-b8</i>		ND
	<i>hMAGE-B9</i>		P	<i>mMage-b9</i>		ND
	<i>hMAGE-B10</i>		T	<i>mMage-b10</i>		ND
	<i>hMAGE-B11</i>	AC005297.1 ₍₁₁₇₃₀₆₋₁₁₆₈₉₀₎	P ^e		AC025874.3 ₍₁₇₄₀₉₅₋₁₇₃₅₀₈₎	
	<i>hMAGE-B12</i>	AC005297.1 ₍₁₄₁₄₀₀₋₁₄₀₈₇₉₎	P ^e		AC025874.3 ₍₉₉₅₆₃₋₉₄₉₇₆₎	
	<i>hMAGE-B13</i>	AC005297.1 ₍₁₇₁₀₁₃₋₁₇₀₇₈₃₎	P ^d		AC025874.3 ₍₁₅₄₀₂₄₋₁₅₄₆₁₁₎	
	<i>hMAGE-B14</i>	AC011693.5 ₍₁₃₄₀₃₆₋₁₃₅₀₇₉₎	P ^d		AC025874.3 ₍₁₂₀₀₅₉₋₁₂₀₆₄₉₎	
	<i>hMAGE-B15</i>	AC011693.5 ₍₁₂₄₆₁₃₋₁₂₅₆₅₃₎	T		AC025874.3 ₍₁₆₄₃₃₄₋₁₆₄₈₄₉₎	
	<i>hMAGE-B16</i>	AC011693.5 ₍₁₁₆₅₁₉₋₁₁₇₅₆₁₎	T		AC025874.3 ₍₄₉₄₄₆₋₄₉₉₆₁₎	
	<i>hMAGE-B17</i>	AC011693.5 ₍₉₉₆₁₀₋₉₈₅₅₉₎	T			
MAGE-C	<i>hMAGE-C1</i>	NT_025279.3 ₍₉₂₇₆₀₁₋₉₂₈₆₀₀₎	P ^d			
	<i>hMAGE-C2</i>	NT_011752.1 ₍₁₉₁₆₇₂₋₁₉₁₂₅₉₎	P ^d			
	<i>hMAGE-C3</i>	NT_025279.3 ₍₁₀₁₈₈₂₇₋₁₀₁₉₇₈₆₎	T			
	<i>hMAGE-C4</i>	NT_011766.3 ₍₈₃₅₇₁₀₋₈₃₅₁₀₂₎	T			
	<i>hMAGE-C5</i>	Ref. 7	T			
	<i>hMAGE-C6</i>	Ref. 8	T			
	<i>hMAGE-C7</i>	AL023279.1 ₍₉₄₁₄₄₋₉₃₈₀₀₎	T			
	<i>hMAGE-C8</i>	NT_025337.2 ₍₄₁₃₀₂₆₋₄₁₃₄₅₇₎	P ^d			
	<i>hMAGE-C9</i>	NT_025337.2 ₍₃₈₇₈₇₇₋₃₈₈₅₀₃₎	P			
	<i>hMAGE-C10</i>	NT_025337.2 ₍₃₆₆₃₈₀₋₃₆₆₇₉₆₎	P			
MAGE-D	<i>hMAGE-D1</i>	Ref. 20	N	<i>mMage-d1</i>	AF319975	N
	<i>hMAGE-D2</i>	Ref. 19	N	<i>mMage-d2</i>	AF319976	N
	<i>hMAGE-D3</i>	AB029037	N	<i>mMage-d3</i>	AF319977	N
	<i>hMAGE-D4</i>	AF320908	N			
MAGE-E	<i>hMAGE-E1</i>	AL096827 ₍₁₀₃₀₄₆₋₁₀₀₁₇₃₎	N	<i>mMage-e1</i>	AF319978	N
	<i>hMAGE-E2</i>	NT_025273.3 ₍₁₉₆₉₅₀₇₋₁₉₇₁₀₇₈₎	N	<i>mMage-e2</i>	AF319983	N
	<i>hMAGE-E3</i>	NT_011954.3 ₍₅₈₉₅₀₀₋₅₉₁₀₀₀₎	N			
MAGE-F	<i>hMAGE-F1</i>	AC016975.3 ₍₁₆₇₈₅₃₋₁₆₆₉₃₀₎	N			
MAGE-G	<i>hMAGE-G1</i>	AC061965.3 ₍₁₄₅₅₀₅₋₁₄₄₀₈₉₎	N	<i>mMage-g1</i>	AF319979	N
				<i>mMage-g2</i>	AF319980	N
MAGE-H	<i>hMAGE-H1</i>	AF320912	N	<i>mMage-h1</i>	AF319981	N
MAGE-I	<i>hMAGE-I1</i>	NT_011638.3 ₍₁₂₃₇₉₅₆₋₁₂₃₈₃₂₆₎	P ^d			
	<i>hMAGE-I2</i>	NT_011638.3 ₍₄₆₂₃₁₋₄₆₈₃₀₎	P ^d			
MAGE-J	<i>hMAGE-J1</i>	NT_011577 ₍₁₀₁₅₇₉₋₁₀₁₉₁₁₎	P ^d			
MAGE-K	<i>hMAGE-K1</i>	Z81311 ₍₁₅₉₉₀₋₁₆₅₈₆₎	P	<i>mMage-k1</i>	AF319984	T
MAGE-L2	<i>hMAGE-L2</i>	Ref. 30	N	<i>mMage-l2</i>	Ref.30	N
NECDIN	<i>hNECDIN</i>	Ref. 29	N	<i>mNecdin</i>	Ref.28	N

1.2 Les gènes MAGE de type I

Les gènes *MAGE* de type I ont leur phase ouverte de lecture située sur leur dernier exon et encodent des protéines de ~ 300 acides aminés.

1.2.1. Les gènes MAGEA

Cette sous-famille contient 12 gènes, situés sur la région q28 du chromosome X humain. Sept d'entre eux (*MAGEA1*, 2, 3, 4, 5, 6 et 12) sont exprimés dans beaucoup de tumeurs de différents types histologiques (De Plaen et al, 1994).

Ces gènes sont silencieux dans les tissus normaux, ce qui est dû à la méthylation de leur promoteur. L'expression tissu-spécifique de ces gènes serait due à une déméthylation de leur promoteur, qui n'a lieu que dans les cellules tumorales et pas dans les cellules normales, excepté les cellules germinales (De Smet et al, 1996).

1.2.2. Les gènes MAGEB

Dix-sept gènes *MAGEB* ont été identifiés chez l'homme, et dix chez la souris. Les seuls tissus normaux où ils sont exprimés sont les testicules.

Les gènes *MAGEB1* et *B2*, situés sur le chromosome X (entre les loci *Dmd* et *Ar* chez la souris et en Xp21.1-22.1 chez l'homme) codent pour la même protéine de 330 acides aminés.

Le gène *MAGEB3*, localisé sur un autosome, a la structure d'un rétrogène (il n'a pas d'intron). Il code pour une protéine qui ne diffère que de 11 acides aminés par rapport aux protéines *B1* et *B2*.

Ces 3 gènes ne sont exprimés que dans les spermatides (De Backer et al, 1995).

Le gène murin *Mageb4* est exprimé dans les gonades, et plus précisément dans les cellules germinales. Chez l'adulte mâle, l'expression de *Mageb4* est restreinte aux cellules « pré pachyténiques ». Par contre, chez la femelle, *Mageb4* est exprimé dans les cellules germinales et dans les cellules qui ont passé la phase pachytène et sont entrées en arrêt de méiose. Ce profil d'expression très spécifique du gène *Mageb4* durant le développement des cellules germinales suggère qu'il joue un rôle pendant la gamétogenèse (Osterlund et al, 1999).

Les gènes *MAGEB5* et *B6* constituent des cibles intéressantes pour l'immunothérapie contre le cancer, car il a été démontré qu'ils codaient pour des antigènes reconnus par les CTL et qu'ils étaient exprimés spécifiquement dans certains types de tumeurs (Lucas et al, 1999).

1.3 Les gènes MAGE de type II

Cette catégorie comprend le gène *necdin* ainsi que les gènes *MAGED*, *E*, *F*, *G*, *H*, *I*, *J*, *K* et *L*.

Contrairement aux gènes *MAGE* de type I, ils sont exprimés dans d'autres tissus

normaux que le testicule et le placenta.

1.3.1. Le gène Necdin

Necdin, premier membre de la famille des gènes *MAGE* de type II a avoir été identifié, encode une protéine de 325 acides aminés hautement conservée entre l'homme et la souris (91% d'identité pour le domaine fonctionnel).

Chez l'homme, necdin est situé sur le chromosome 15, dans une région associée au syndrome de Prader Willi (q11-13).

Cette région chromosomique est soumise à l'empreinte, un phénomène génétique qui fait qu'un gène est exprimé différemment en fonction du parent d'origine. Le syndrome de Prader Willi (P.W.S.), une maladie neurogénétique concernant une naissance sur 10.000, résulte dans la plupart des cas de la délétion de l'allèle paternel des gènes empreints (dont necdin et *mage L2*) localisés dans cette région 15q11-13. Les individus atteints du syndrome de Prader Willi présentent de l'hyperphagie menant à l'obésité, un retard du développement, de l'hypogonadisme, un retard mental, ...

Chez la souris, la région C du chromosome 7 est synténique à la région 15q11-13 de l'homme et contient des gènes homologues, comme Necdin. La mutation de Necdin chez la souris provoque des effets observés chez les patients atteint du P.W.S., comme des difficultés respiratoires, une létalité postnatale, une diminution du nombre de neurones hypothalamiques produisant l'ocytocine (OT) et la LH-RH (luteinizing hormone-releasing hormone) et des altérations comportementales. Cela suggère donc qu'une déficience en Necdin est en partie responsable du P.W.S. (Muscатели et al, 2000).

Necdin interagit avec E2F1, un facteur de transcription impliqué dans le cycle cellulaire. Pendant la phase G1 du cycle cellulaire, E2F1 est séquestré par la protéine du rétinoblastome (Rb). Lors de la transition G1-S, Rb est phosphorylé et libère E2F1, qui peut alors activer la transcription de gènes nécessaires à la réplication de l'ADN. Rb est entre autre impliqué deans l'arrêt du cycle cellulaire des neurones qui viennent de se différencier et doivent rester dans un état postmitotique.

Tout comme Rb, Necdin interagit avec le large antigène T du virus SV40, la protéine E1A des adénovirus, et le facteur de transcription E2F1. Necdin est en fait un suppresseur de croissance spécifique aux neurones, et fonctionnelement similaire à Rb (Taniura et al, 1997).

De plus, Necdin serait une protéine anti-apoptotique prévenant la mort des neurones par inhibition de E2F1 et par interaction avec p75NTR (Kuwado et al, 2003).

Des études récentes ont montré que, durant le développement du système nerveux de la souris, la protéine necdin était exprimée uniquement dans les neurones, et que le profil de distribution de l'ARNm était identique à celui de la protéine. (Andrieu et al, 2003)

1.3.2. Les gènes MAGED

Les gènes *MAGED* (localisés en Xp11.3) contiennent 13 exons, dont 11 sont codant (exons 2 à 12). Cela les différencie des autres gènes *MAGE*, qui sont composés de 3 ou 4 exons, avec leur séquence codante située dans le dernier exon (Fig. 3). Cela suggère que les gènes *MAGED* seraient les ancêtres de tous les autres gènes *MAGE*, générés par rétro-position et duplications. Les gènes *MAGED* sont très bien conservés entre l'homme et la souris. Les régions flanquant le MCD montrent une homologie plus importante entre les orthologues humains et murins qu'entre les paralogues de *MAGED*. Cela indique que les gènes *MAGED* sont apparus avant la séparation phylogénétique de l'homme et de la souris et que les différentes protéines *MAGED* ont des fonctions distinctes (Chomez et al, 2001).

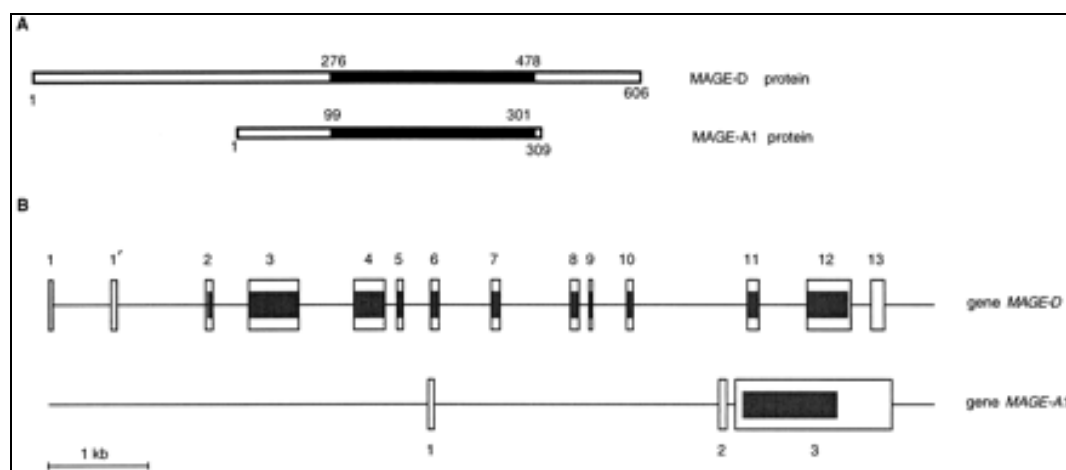


Fig. 3 : A : Comparaison des protéines *MAGED* et *MAGEA1* avec en noire la région d'homologie.
B : Structure du gène *MAGED* et du gène *MAGEA1*, qui est représentatif des gènes *MAGEA*, B, et C.
—, introns ; □ exons ; ■ séquences codantes.

La région d'homologie entre les 3 protéines *Maged* de la souris comprend le MCD et les 40 acides aminés en amont de celui-ci (Fig.4).

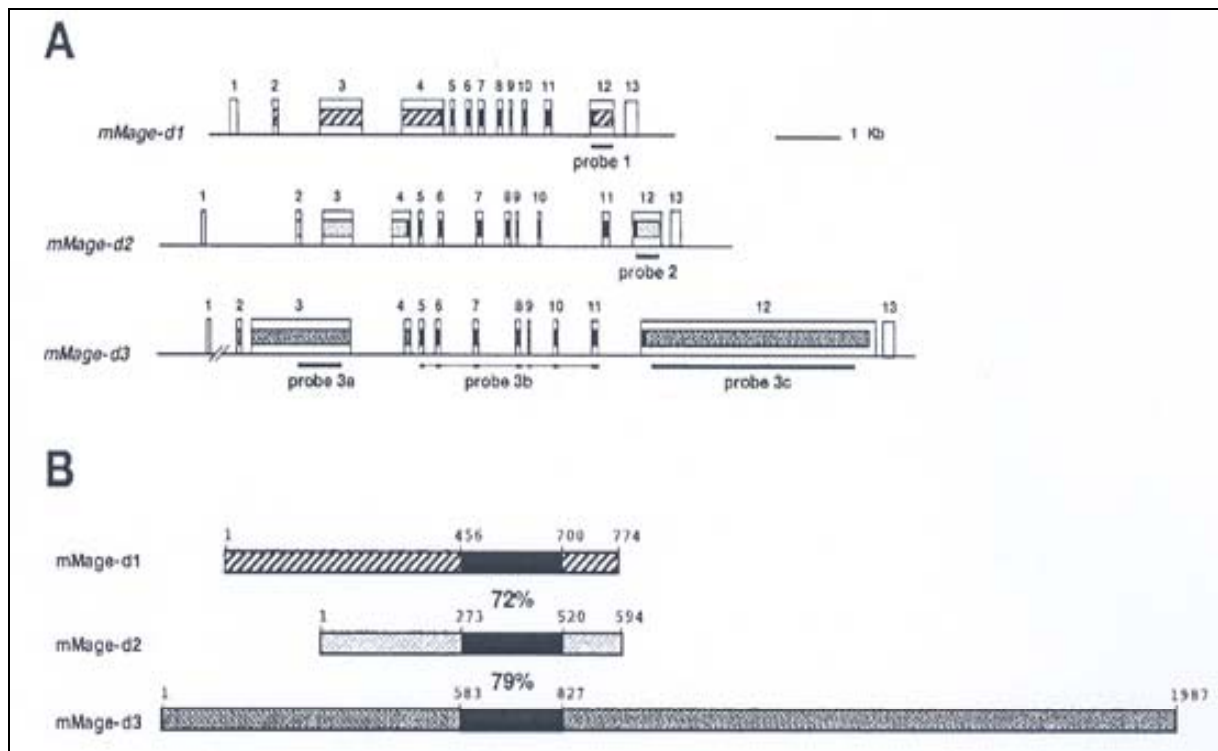


Fig. 4 : A : Organisation génomique des gènes *Maged* chez la souris
B : Comparaison des protéines *Maged* chez la souris, avec en noir la région d'homologie.

1.3.2.1. MAGED1

Durant l'embryogenèse de la souris, *Maged1* est exprimé dans tout le système nerveux ainsi que dans des organes tels que les poumons, le pancréas et le tube digestif.

A la naissance (P0), son expression est détectée dans les zones ventriculaires (Z.V.) ainsi que dans les neurones migratoires et post-migratoires de tout le cerveau. Par après (P10), on ne le détecte plus au niveau des Z.V. Dans le cerveau en maturation, la quantité d'ARNm de *Maged1* augmente avec l'âge alors que le niveau de protéines diminue, ce qui signifie que *Maged1* est régulé post-transcriptionnellement (Bertrand et al, 2004).

Chez l'homme, *MAGED1* est fortement exprimé dans le cerveau, le foie et les reins du fœtus, ainsi que dans le cerveau adulte (Bertrand et al, 2004).

Différents partenaires de *Maged1* ont été identifiés, notamment p75NTR, un récepteur aux neurotrophines impliqué dans l'apoptose. *Maged1* serait un composant de la voie intracellulaire de p75NTR, le MCD du premier interagissant avec le domaine intracellulaire du second. (Salehi et al, 2000)

1.3.2.2. MAGED2

L'expression de *Maged2* chez l'embryon de la souris, complémentaire à celle de *Maged3*, est faible dans le cerveau et importante dans le reste du corps, notamment dans les divers muscles lisses et striés squelettiques. Par contre, à la naissance on observe la présence de *Maged2* dans les régions prolifératives et en différenciation du cerveau. Chez l'adulte (P60), *Maged2* n'est plus détecté dans le cerveau. (Bertrand et al, 2004)

Chez l'homme, des résultats semblables ont été obtenus pour l'embryon (faible expression dans le cerveau), mais pas pour l'adulte (*MAGED2* est exprimé dans le cerveau). (Bertrand et al, 2004)

2. Recherche de partenaires de Maged1 et Maged2

2.1 Le double-hybride (Van Crielinge et al, 1999)

La méthode du double-hybride, qui a été mise au point en 1989, permet d'étudier des interactions entre protéines, en se basant sur les propriétés de la protéine GAL4 de la levure *Saccharomyces Cerevisiae*.

Comme beaucoup d'autres facteurs de transcription eucaryotes, GAL4 possède 2 domaines, l'un liant l'ADN (DNA binding domain ou BD) et l'autre activant la transcription (activation domain ou AD). Le BD reconnaît une séquence d'ADN du promoteur du gène régulé par GAL4, appelé l'UAS. La présence de l'AD est indispensable pour le recrutement de la machinerie de transcription. Le double-hybride consiste à fusionner une protéine X (appelée « appât ») au BD et une protéine Y (appelée « proie ») à l'AD et de les introduire dans la levure. L'interaction entre les protéines X et Y conduit à la reconstruction d'un facteur GAL4 fonctionnel pouvant activer la transcription d'un gène rapporteur.

Les 2 gènes rapporteurs que nous avons utilisés sont Lac Z et His3. Le gène Lac Z code pour la β -galactosidase, une enzyme dont l'activité est facilement mesurable. Le gène His3 code pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'histidine, et permet à la levure de pousser sur un milieu dépourvu d'histidine.

Notons qu'il existe un autre système que celui basé sur GAL4, qui utilise le BD de la protéine bactérienne LexA et l'AD de VP16. Dans ce cas, d'autres gènes rapporteurs sont utilisés.

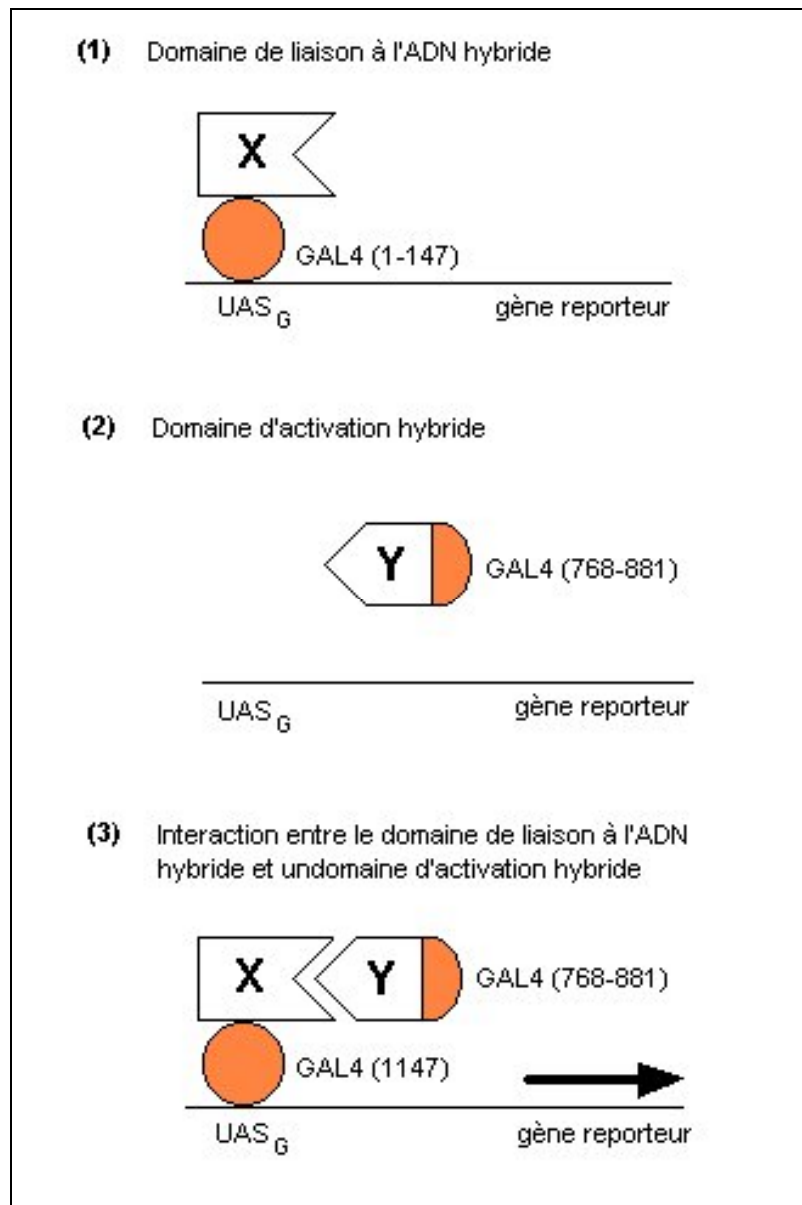


Fig. 5 : Représentation schématique de la technique du double-hybride.

Le double-hybride peut être utilisé pour vérifier une interaction connue entre 2 partenaires ou pour rechercher les partenaires d'une protéine d'intérêt. Dans ce cas, une librairie contenant toute une série de protéines « proie » en fusion avec le domaine d'activation de GAL4 est criblée avec la protéine « appât » fusionnée au BD.

2.2 Les partenaires de Maged1

2.2.1. p75NTR (Voir la revue de Roux et Barker, 2002)

Les neurotrophines sont des facteurs de croissance impliqués dans la survie et la

différenciation neuronale, la régulation de l'activité synaptique, l'apoptose, ...

Chez les mammifères, il existe 4 neurotrophines :

- . NGF (nerve growth factor)
- . BDNF (brain-derived neurotrophic factor)
- . NT-3
- . NT-4/5

Ces protéines exercent leurs effets en se liant à 2 types de récepteurs cellulaires : les récepteurs Trk et p75NTR.

Les récepteurs Trk sont des protéines transmembranaires de la superfamille des récepteurs tyrosine kinase. Chacun des 3 membres de cette famille lie préférentiellement un type de neurotrophine (TrkA lie NGF, TrkB lie BDNF et NT-4/5, TrkC lie NT-3).

Le récepteur aux neurotrophines p75 (p75NTR) fait partie de la superfamille des récepteurs au TNF. Il lie toutes les neurotrophines avec la même affinité.

Le gène p75NTR contient 6 exons situés sur la région chromosomique 17q12-17q22 et code pour une protéine transmembranaire de type I de 399 acides aminés.

p75NTR a 2 rôles principaux :

- . moduler le signaling des récepteurs Trk
- . initier des cascades régulant la survie et l'apoptose.

p75NTR augmenterait la spécificité de liaison des Trk avec leurs ligands, en réduisant la liaison entre les Trk et leurs ligands « non préférés ».

Quand TrkA et p75NTR sont co-exprimés, ce dernier facilite la liaison du NGF à TrkA, ce qui augmente l'activation de TrkA. Cela se ferait par une interaction physique entre les 2 récepteurs. En effet p75NTR et TrkA ont été co-localisés au niveau de la membrane plasmique et p75NTR a pu être co-immunoprécipité avec les 3 types de récepteurs Trk (Ross et al, 1996).

Plusieurs études ont montré que p75NTR induit l'apoptose, aussi bien *in vitro* que *in vivo*. La cascade de signalisation activée par p75NTR n'est pas encore bien connue, mais elle diffère de celle des autres membres de la superfamille des TNFR. En effet, p75NTR ne lie pas TRADD ou FADD et ne permet pas l'activation de la caspase 8. Par contre, on sait que p75NTR est impliqué dans la libération du cytochrome c des mitochondries, l'activation de la caspase 9, l'activation de la voie de JNK /c-Jun et l'activation de p53.

Paradoxalement, p75NTR médie aussi des signaux de la survie cellulaire, notamment en activant NFκB (par l'intermédiaire de TRAF). Mais cela n'a rien d'étonnant, car plusieurs membres de la superfamille des TNFR ont un rôle à la fois pro-apoptotique et anti-apoptotique.

D'autres rôles sont attribués à p75NTR, comme la régulation de la transmission

synaptique et de l'élongation des axones (Voir la revue de Dechant et Barde, 2002). C'est par un crible double-hybride que Maged1 a été identifié comme un partenaire de p75NTR et il a été nommé NRAGE pour **N**eurotrophine **R**eceptor interacting **MAGE** homolog. Par son MCD, NRAGE se lie au domaine intracellulaire juxtamembranaire de p75NTR (Salehi et al, 2000).

NRAGE ferait partie de la même voie de signalisation que p75NTR. En effet, l'apoptose induite par NRAGE implique la libération du cytochrome c, l'activation de caspases, et l'activation de la JNK menant à l'accumulation de c-Jun. (Salehi et al, 2002)

On sait également depuis peu que NRAGE inhibe la croissance cellulaire par la régulation de p53 (Wen et al, 2004).

2.2.2. **Dlx 5 / Msx 2**

Msx 2 et Dlx 5 sont des protéines à homéodomaine jouant un rôle important dans le développement des os et la réparation des fractures (Masuda et al, 2000). La région amino-terminale de Dlx5 contient un domaine d'activation transcriptionnelle. Un crible double-hybride de ce domaine a été réalisé, permettant d'isoler Maged1 (nommé Dlxin-1 pour **Dlx** interaction) comme partenaire de Dlx5 (Masuda et al, 2000). Cette interaction a été démontrée *in vitro* et *in vivo*, conditions dans lesquelles Maged1 s'associe également avec Msx2. Par des systèmes utilisant des gènes rapporteurs, il a été montré que Maged1 active la transcription dépendante de Dlx5, et que cette régulation est fonction de la quantité de Maged1.

2.2.3. **Praja 1**

Un crible double-hybride utilisant comme appât le MCD de Maged1 a permis d'isoler deux protéines murines « RING finger » : Praja 1 et Neurodap1.

Beaucoup de protéines « RING finger » possèdent une activité E3 (ubiquitine ligase). La protéine Maged1 est reconnue et ubiquitinylée via Praja1 puis dégradée par le protéasome. De plus, Msx2, qui forme des complexes avec Praja 1 et Maged1, est également dégradé en présence de Praja1. Maged1 servirait donc de molécule adaptatrice permettant aux protéines de la famille Dlx/Msx d'être reconnues par le protéasome. (Sasaki et al, 2001)

2.2.4. **IAP** (Voir la revue de Deveraux et Reed, 1999)

Les IAPs (inhibitor of apoptosis) sont des protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose. Les membres de cette famille (XIAP, CIAP1, CIAP2, NAIP et la survivine) possèdent un domaine BIR du côté amino-terminal ainsi qu'un domaine RING en doigt de zinc du côté carboxy-terminal. Les protéines IAP exercent leur fonction anti-apoptotique via leur domaine BIR.

Maged1 interagit avec ITA (inhibitor of T cell apoptosis), un homologue aviaire de IAP, et avec XIAP, aussi bien en double-hybride qu'en co-immunoprécipitation. Dans le cas de ITA, cette interaction requiert la présence du RING domaine mais pas du domaine BIR. (Jordan et al, 2001)

2.2.5. Ror 2

Un crible double-hybride avec les régions cytoplasmiques de Ror1 et Ror2 a permis d'identifier Maged1 comme candidat potentiel interagissant avec ces deux protéines (Matsuda et al, 2003). Des tests *in vivo* ont ensuite montré que seul Ror2 s'associait à Maged1.

Ror2 est une protéine de la famille des récepteurs tyrosine kinases, jouant un rôle crucial dans la morphogenèse du développement. L'association entre Ror2 et Maged1 requiert le domaine C-terminal riche en prolines de Ror2 et le MCD de Maged1. Elle ne dépend pas de l'activité kinase de Ror2.

Les profils d'expression de Maged1 et Ror2 se superposent, surtout au niveau de la face et des membres en développement, ce qui suggère que l'interaction entre Ror2 et Maged1 pourrait intervenir durant le développement de la souris.

Comme on l'a vu plus haut, Msx2 est également un partenaire de Maged1. L'association de Ror2 et Msx2 avec Maged1 est compétitive. En effet, Maged1 et Msx2 sont co-localisés dans le noyau en absence de Ror2. Quand celui-ci est exprimé, Maged1 co-localise avec Ror2 au niveau des compartiments membranaires et Msx2 est retenu dans le noyau. Ror2 régule donc l'activité transcriptionnelle de Msx2 par la séquestration de Maged1.

2.2.6. UNC5H1 (Williams et al, 2003)

Les UNC5H sont des récepteurs médiant d'une part la chémo-répulsion dépendante de netrin-1, et d'autre part l'apoptose indépendante de netrin-1.

L'apoptose médiée par UNC5H1 est au moins deux fois plus importante que celle médiée par les deux autres membres de cette famille, à savoir UNC5H2 et UNC5H3.

Par un crible double-hybride, Maged1 a été identifié comme partenaire de UNC5H1, et cette interaction a été confirmée *in vitro* (GST pull down) ainsi que par co-immunoprécipitation à partir de cellules transfectées avec les deux gènes.

UNC5H2 et UNC5H3 interagissent quant à eux beaucoup moins fortement avec Maged1 que UNC5H1.

Il a été montré que l'induction de l'apoptose ainsi que la liaison à Maged1 de UNC5H1 requièrent la région juxtamembranaire de ce dernier, constituée d'une courte séquence PEST (non trouvée chez UNC5H2 et UNC5H3) suivie d'un domaine ZU-5.

Dans des PC12 différenciés (en neurones), l'expression de Maged1 est réprimée et la surexpression de UNC5H1 ne suffit pas pour médier l'apoptose. Pour que celle-ci ait lieu, Maged1 doit aussi être surexprimé, ce qui suggère que Maged1 est requis pour l'apoptose médiée par UNC5H1.

2.2.7. LRP1, un partenaire potentiel de Maged1

La protéine LRP1 (low density lipoprotein receptor-related protein 1) fait partie de la famille des récepteurs aux lipoprotéines, qui comprend LDLR (low density lipoprotein receptor), apoER2 (apolipoprotein E receptor 2), VLDLR (very low density lipoprotein receptor), LRP1, LRP1B, LRP2 (ou mégaline), LRP5 et LRP6.

LRP1 est synthétisée sous forme d'une protéine précurseur de 600kDa (4525 acides aminés), clivée par une endopeptidase du trans-golgi (la protéase furin-like) en deux sous-unités :

- . Une sous-unité α de 515 kDa (3925 acides aminés) extracellulaire, contenant un domaine de liaison aux ligands et restant attachée en membrane.
- . Une sous-unité β de 85 kDa (600 acides aminés) constituée d'un domaine transmembranaire et d'une queue cytoplasmique de 100 acides aminés contenant 2 motifs NPXY.

Plus de 20 ligands de LRP1 ont été identifiés. Ils participent à des processus physiologiques et pathologiques tels que l'homéostasie des lipoprotéines du plasma, la fibrinolyse, l'athérosclérose, ainsi que la régénération et la survie neuronale. (Smeijers et al, 2002)

Tout comme les autres membres de la famille des récepteurs aux lipoprotéines, la queue cytoplasmique de LRP1 interagit avec différents adaptateurs et des protéines « scaffold », comme FE65, DAB-1, JIP1/2, PSD-95,... Ces protéines ont des rôles dans la régulation de la transmission synaptique, l'activation et la modulation de la voie des MAPK, l'organisation locale du cytosquelette, l'adhésion cellulaire, et l'endocytose. (Gotthardt et al, 2000)

Un des membres typiques de la famille des récepteurs aux lipoprotéines est le LDLR, qui lie des molécules extracellulaires et les internalise. Jusqu'il y a peu, on pensait que tous les membres de cette famille jouaient uniquement un rôle comme médiateur de l'endocytose. Mais on sait maintenant que certains d'entre eux transmettent un signal.

Plusieurs arguments supportent l'idée selon laquelle LRP1 aurait un rôle dans la transduction du signal.

Il a été montré que la queue cytoplasmique de LRP1 se faisait phosphoryler sur un des résidus tyrosine, ce qui lui permet de s'associer à la protéine Shc, les deux motifs NPXY de LRP1 se liant au domaine PTB de Shc. Ce recrutement de Shc est suivi par l'activation de Ras (via Grb2 et SOS). Shc étant un médiateur bien connu de la transduction du signal dans différents systèmes, cette association est un argument en faveur de la participation de LRP1 dans la transduction du signal. (Van der Geer, 2002).

L'hypothèse d'une signalisation via LRP1 est appuyée par le fait que d'autres membres de la famille des récepteurs aux lipoprotéines, comme apoER2, VLDLR, LRP5 et LRP6, jouent effectivement un rôle dans la transduction du signal. Par

exemple, VLDLR et apoER2 sont des composants de la voie signalétique initiée par reelin, une protéine impliquée dans la migration neuronale. De même, LRP5 et 6 sont des co-récepteurs dans la transmission du signal de la voie wnt (Gotthardt et al, 2000).

2.3 Les partenaires de Maged2

2.3.1. Gs α , un partenaire potentiel de Maged2

Le gène murin *gnas* et son homologue humain *GNAS1* codent pour la sous-unité α de la protéine Gs (Gs α). La protéine Gs α fait partie de la famille des sous-unités α des protéines G hétérotrimériques.

Gs α stimule la production d'AMPc par activation de l'adénylate cyclase, enzyme catalysant la transformation de l'ATP en AMPc.

Chaque protéine G possède sa sous-unité α spécifique et active différents effecteurs, mais le principe est toujours le suivant.

Au repos, la sous-unité α de la protéine G est liée à du GDP. Lorsque le récepteur couplé à la protéine G est activé par la liaison de son ligand, le GDP est remplacé par du GTP, ce qui libère la sous-unité α et lui permet d'activer un effecteur (une enzyme), qui à son tour va catalyser une réaction.

La sous-unité α possède une activité GTPase intrinsèque, ce qui lui permet de transformer le GTP en GDP et de se réassocier aux sous-unités β et γ , inactivant ainsi l'effecteur.

Dans le cas de la protéine Gs, cet effecteur est l'adénylate cyclase, enzyme permettant la production d'AMPc. L'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc va induire à son tour différentes réponses à l'intérieur de la cellule (Weinstein et al, 2001).

Les gènes *GNAS 1* (situé en 20q13) et *gnas* (situé sur une portion du chromosome 2 de la souris synténique à 20q13) sont des gènes complexes, qui contiennent au moins quatre promoteurs et quatre premiers exons générant plusieurs transcrits par épissage alternatif entre le premier exon et l'exon 2 commun aux différents transcrits (Fig.6)

Parmi les premiers exons, l'exon le plus 5' est l'exon 1.

Un second promoteur génère XLas, une isoforme de Gs α spécifique du golgi, possédant une longue extension N-terminale encodée par son premier exon, et une portion carboxy-terminale encodée par les exons 2-13.

Le troisième promoteur génère NESP55, une protéine neuroendocrinienne ressemblant à la chromogranine. Les exons 2-13 sont situés dans la région 3'UTR (c'est-à-dire non traduite) du transcrit de NESP55.

Enfin, un quatrième promoteur, suivi d'un premier exon nommé 1A, génère un transcrit sans doute non traduit et dont la fonction reste inconnue (Liu et al, 2000).

Les gènes *gnas* et *GNAS 1* sont soumis à l'empreinte.

Les transcrits XLas et NESP55 sont empreints de façon opposée. En effet, le promoteur *Nesp* est méthylé sur l'allèle paternel et le transcrit n'est généré qu'à

partir de l'allèle maternel. A l'inverse, le promoteur *Gnasxl* est méthylé sur l'allèle maternel et seul l'allèle paternel s'exprime (Fig.6).

Quant à $G\alpha$, il est empreint de manière tissu-spécifique, c'est-à-dire exprimé à partir des deux allèles dans beaucoup de tissus, et exprimé seulement maternellement dans certains autres. Mais cette expression allèle-spécifique n'est pas due à une méthylation du promoteur de l'allèle paternel (Liu et al, 2000).

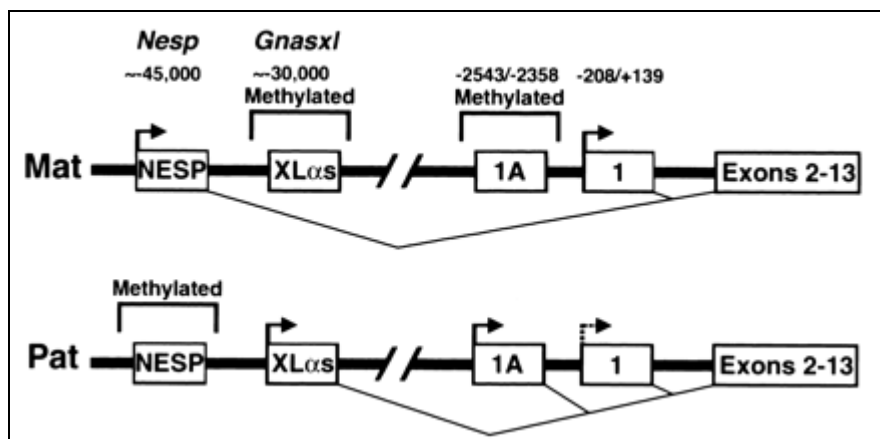


Fig. 6 : Représentation schématique des allèles maternel et paternel du gène *gnas*.
Quatre transcrits alternatifs sont générés par splicing alternatif entre les 4 premiers exons et les exons 2-13.
Les promoteurs de *NESP55* et *XLas* sont nommés respectivement *Nesp* et *Gnasxl*.

3. Objectifs du mémoire

L'objectif de mon mémoire est de mettre en évidence des partenaires de Maged1 et Maged2, dont les fonctions sont peu connues. Plusieurs protéines interagissant avec Maged1 ont déjà été identifiées, par contre aucun partenaire de Maged2 n'a été décrit à ce jour.

Une première partie du travail a consisté à vérifier l'interaction entre Maged1 et un de ses partenaires bien connu, p75NTR. Etant donné que Maged1 lie p75NTR par une région commune aux gènes *Mage*, nous avons également essayé de mettre en évidence une éventuelle interaction entre Maged2 et p75NTR.

En vue de rechercher des partenaires de Maged1 et Maged2, un crible double-hybride a été réalisé avec les deux gènes correspondants.

Le crible de Maged1 nous a permis d'identifier un partenaire potentiel de ce dernier : LRP1. Nous avons ensuite essayé de confirmer cette interaction par double-hybride.

Le crible de Maged2 a permis de mettre en évidence le gène *gnas*, qui code pour la protéine $G\alpha$. Cette interaction a été confirmée en double-hybride ainsi que par co-immunoprécipitation *in vitro*. Les gènes *Maged2* et *gnas* ont ensuite été transfectés dans des cellules COS en vue de réaliser une co-immunoprécipitation entre les protéines Maged2 et $G\alpha$. De plus, nous avons testé par double-hybride une éventuelle interaction entre Maged1 et $G\alpha$.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Etude des interactions physiques entre Maged1 et p75NTR et entre Maged2 et p75NTR

L'interaction entre Maged1 et p75NTR a été mise en évidence quand un groupe de chercheurs travaillant sur p75NTR a identifié Maged1 lors d'un crible double-hybride en vue de trouver des protéines partenaires (Salehi et al, 2000). L'appât utilisé pour le crible était le domaine intracellulaire de p75NTR. Le fragment d'ADNc de *Maged1* qui a été identifié code pour un fragment de 300 acides aminés (aa 410 à 709), qui inclut le MCD.

Au laboratoire, nous avons essayé de confirmer cette interaction en double-hybride en utilisant le domaine intracellulaire de p75NTR comme appât et Maged1 comme proie. Pour la construction de la proie, nous avons utilisé d'une part un fragment d'ADNc encodant les acides aminés 410 à 774 et d'autre part un fragment d'ADNc correspondant à la protéine Maged1 entière (Fig. 7a). Ces deux fragments ont été testés avec la partie cytoplasmique de p75NTR (Fig. 7c).

Pour tester si Maged2 interagit également avec p75NTR, nous avons réalisé un test double-hybride avec p75NTR comme appât et Maged2 comme proie. Tout comme pour Maged1, deux fragments d'ADN ont été utilisés : un fragment correspondant à la protéine entière, et un autre encodant le MCD et la partie carboxy-terminale de Maged2 (Fig. 7b).

1.1 Construction de pACT2-*d1*, pACT2-*d2* et pGBT9-p75

Pour pouvoir utiliser nos gènes d'intérêt en double-hybride, nous les avons clonés dans des vecteurs générant des protéines de fusion. *Maged1* et *Maged2* ont été clonés dans le vecteur pACT2, de manière à les fusionner avec le domaine d'activation de GAL4. Le fragment intracellulaire de p75NTR a été cloné dans le vecteur pGBT9 de façon à le fusionner avec le domaine de liaison à l'ADN de GAL4.

1.1.1. Clonage des inserts dans pCRII

Les deux fragments de *Maged1* ont été obtenus par amplification PCR. La matrice utilisée pour l'amplification était un plasmide contenant l'ORF de *Maged1*. Les amorces ODB231 et ODB173 ont été utilisées pour le grand fragment ; les amorces ODB232 et ODB173 ont été utilisées pour le petit fragment. Toutes ces amorces sont flanquées de sites EcoRI.

La même séquence d'opération a été réalisée pour obtenir les fragments de *Maged2* en utilisant les amorces ODB233 et ODB176 pour le grand fragment ; ODB234 et ODB176 pour le petit.

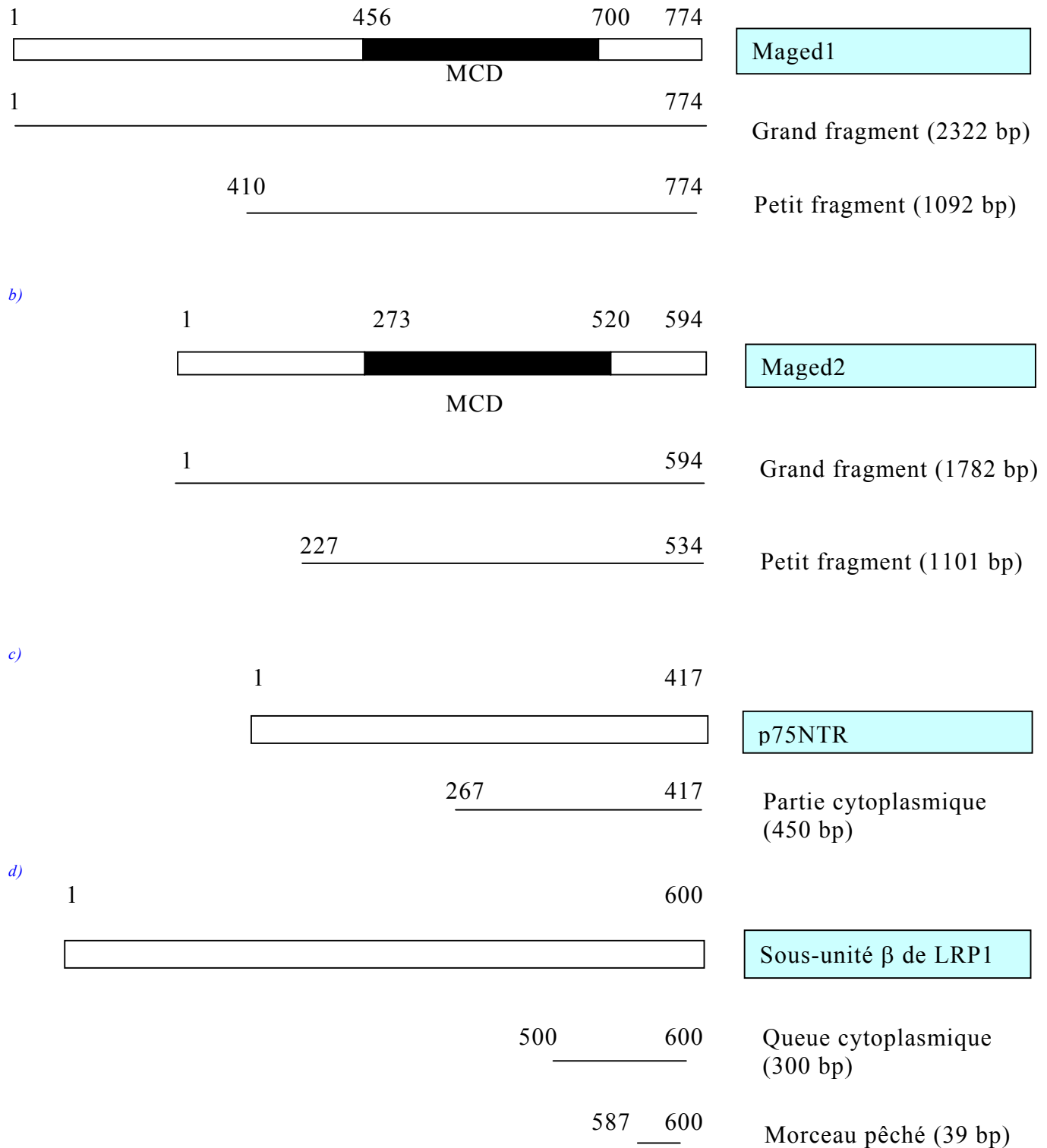


Fig. 7 : Représentation schématique des constructions utilisées dans les différentes expériences de double- hybride
Les chiffres représentent les numéros des acides aminés

La séquence encodant la partie cytoplasmique de p75NTR a été amplifiée par PCR

sur de l'ADNc de cerveau d'embryon de souris (E19), avec des amorces flanquées de sites EcoRI (ODB230 et ODB181).

Les cinq produits PCR obtenus ont été insérés par ligation dans pCRII (Fig. 8), et les produits de ligation ont servi à transformer des bactéries E. coli.

Des PCR sur les colonies résistantes à l'ampicilline obtenues, avec des amorces situées de part et d'autre du site de clonage de pCRII, ont permis de détecter des clones contenant des plasmides recombinants.

Pour chaque construction, de l'ADN plasmidique a été préparé à partir de plusieurs clones. Après vérification de la séquence des inserts, un clone par construction a été retenu.

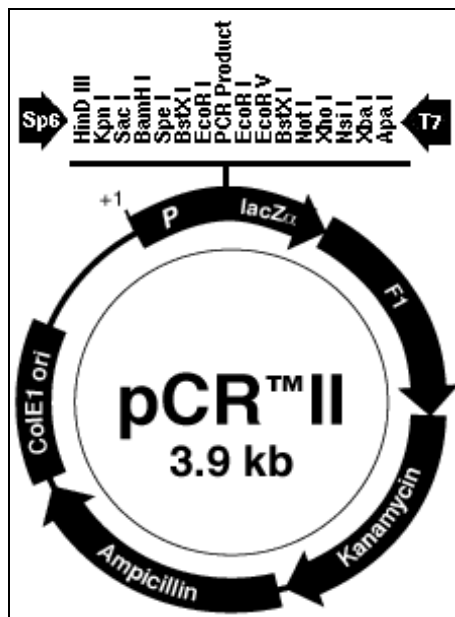


Fig. 8 : carte du vecteur pCRII

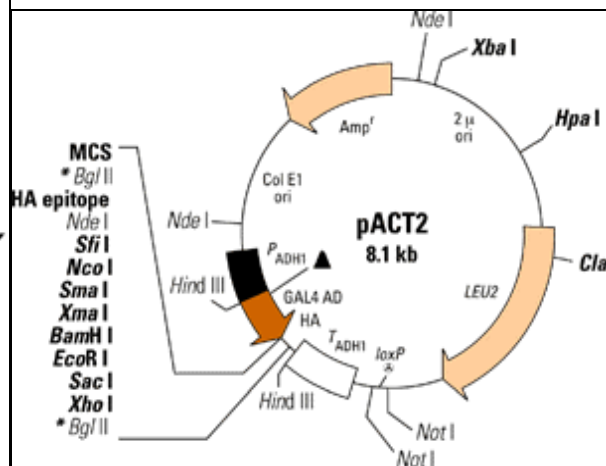


Fig. 9 : carte du vecteur pACT2

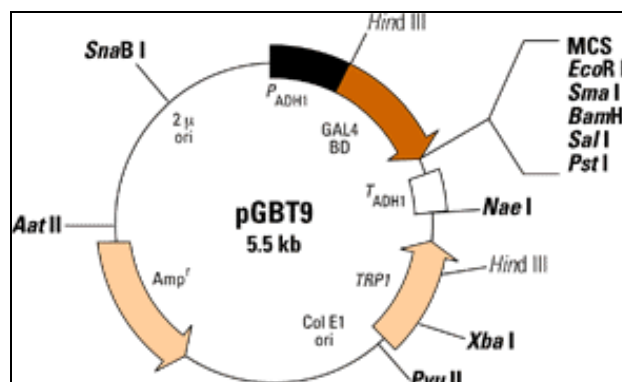


Fig. 10 : carte du vecteur pGBT9

1.1.2. Clonage des inserts dans pACT2 et pGBT9

Les inserts des 5 clones ont été libérés de pCRII par digestion EcoRI et ligués avec les vecteurs appropriés (pACT2 ou pGBT9) linéarisés par EcoRI. Les produits de ligation ont été transformés dans des bactéries E.coli, et des PCR ont permis d'identifier des clones contenant des plasmides recombinants. De l'ADN a été préparé à partir de plusieurs clones et les jonction de clonage vérifiées par séquençage.

1.2 Test d'interaction double-hybride dans la levure

Nous avons réalisé une transformation de la levure *S. cerevisiae* (souche Y190). Les deux constructions *Maged1* (petit fragment et grand fragment) et les deux constructions *Maged2* (petit fragment et grand fragment) ont été testées avec p75NTR.

Pour vérifier que les gènes rapporteurs ne sont pas activés par la présence d'un seul partenaire et détecter un éventuel bruit de fond, nous avons réalisé des co-transformations avec pACT2-*Maged1* et pGBT9 (sans insert); avec pACT2-*Maged2* et pGBT9 (sans insert); et avec pGBT9-p75NTR et pACT2 (sans insert).

Un contrôle positif a également été inclus : une co-transformation avec pVA3 et pTD1. Le plasmide pTD1 encode l'antigène T du virus SV40 fusionné avec le domaine d'activation de GAL4, et pVA3 encode la protéine murine p53 fusionnée avec le domaine de liaison à l'ADN de GAL4.

Nous avons sélectionné les levures ayant intégré les deux plasmides sur un milieu dépourvu de leucine et de tryptophane. Le vecteur pACT2 contient le gène LEU2 permettant à Y190 de pousser sur milieu sans leucine et le vecteur pGBT9 contient le gène TRP qui permet à Y190 de pousser sur milieu sans tryptophane.

Les colonies de levure LEU⁺ TRP⁺ obtenues ont été repiquées et nous avons testé l'activation du gène rapporteur LacZ. Pour ce faire, une couche d'agarose contenant du X-gal (un substrat de la β -galactosidase) a été coulée sur les boîtes. Si les protéines hybrides interagissent, le facteur de transcription GAL4 est reconstitué et active la transcription du gène LacZ encodant la β -galactosidase. Celle-ci clive son substrat et une coloration bleue apparaît. Les colonies du contrôle positif ont effectivement pris la couleur bleue attendue, indiquant que le gène LacZ a été activé. Par contre, aucune des colonies des 4 tests ne s'est colorée en bleu ([Tableau 2](#)). Cela indique soit qu'il n'y a pas d'interaction entre Maged1/d2 et p75NTR, soit que cette interaction est trop faible pour être détectée de cette manière.

Nous avons donc mesuré l'activité β -galactosidase dans des lysats de levure en utilisant l'ONPG (o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) comme substrat. De nouveau, le contrôle positif a bien pris la coloration jaune attendue, mais les 4 tests pas ([Tableau 2](#)).

Nous avons alors utilisé une méthode de dosage réputée encore plus sensible, utilisant le CPRG (chlorophenolred- β -D-galactopyranoside) comme substrat de la β -

galactosidase. Si le gène LacZ est activé, une coloration orangée doit apparaître. Des résultats négatifs identiques à ceux décrits ci-dessus ont été obtenus (Tableau 2).

Tableau 2 : Résultats du double-hybride entre Maged1 /d2 et p75NTR, avec le gène rapporteur LacZ.
Les levures ont poussé sur milieu SD-Trp-Leu et l'activité de la β -galactosidase a été testée
- : Les levures n'ont pas pris la coloration résultant de l'activité β -galactosidase
+ : Les levures ont pris la coloration résultant de l'activité β -galactosidase

			Appât		
			pGBT9	pGBT9-p75NTR	pVA3
Proie	pACT2			-	
	pACT2-Maged1	petit	-	-	
		grand	-	-	
	pACT2-Maged2	petit	-	-	
		grand	-	-	
	pTD1				+

Nous avons donc conclu qu'il n'y avait pas d'activation détectable du gène rapporteur LacZ.

Suite à cela, nous avons testé l'activation du second gène rapporteur, HIS3.

Pour ce faire, nous avons répliqué les colonies de levures sur un milieu minimum dépourvu de leucine, de tryptophane et d'histidine.

Normalement, les levures dont le gène HIS3 n'est pas activé grâce au facteur de transcription GAL4 ne devraient pas pousser sur un milieu sans histidine. Mais en réalité ce gène rapporteur est souvent faiblement activé, ce qui permet à la levure de s'affranchir, dans une certaine mesure, de sa dépendance en histidine.

Pour inhiber l'expression basale de HIS3 et ainsi abaisser le bruit de fond, il faut ajouter du 3AT (3 aminotriazol) au milieu de culture.

Nous avons ainsi testé différentes concentrations de 3AT (de 2mM à 75mM). Les concentrations inférieures à 75mM ne permettaient pas de supprimer le bruit de fond : les levures transformées avec les contrôles négatifs (pACT2-Maged1+pGBT9, pACT2-Maged2+pGBT9 et pGBT9-p75NTR+pACT2) poussaient malgré l'absence d'histidine. Par contre, 75mM de 3AT s'avérait être la concentration adéquate pour éliminer le bruit de fond.

En ce qui concerne Maged1 (aussi bien le petit fragment que le grand), un léger bruit de fond persistait pour le contrôle négatif (pACT2-Maged1+pGBT9). Avec pGBT9-p75NTR, quelques colonies en plus parvenaient à pousser (31 contre 9 pour le petit fragment et 45 contre 17 pour le grand) (Fig. 11 et Fig. 12).



Fig. 11 : Résultats du test d'interaction double-hybride entre Maged1 (petit fragment) et p75NTR, avec le gène rapporteur HIS3
Les levures Y190 ont poussé sur milieu SD-Trp-Leu-His+75mM de 3AT, pendant 10 jours
A gauche : contrôle négatif (pACT2-Maged1+pGBT9) A droite : test (pACT2-Maged1+pGBT9-p75NTR)

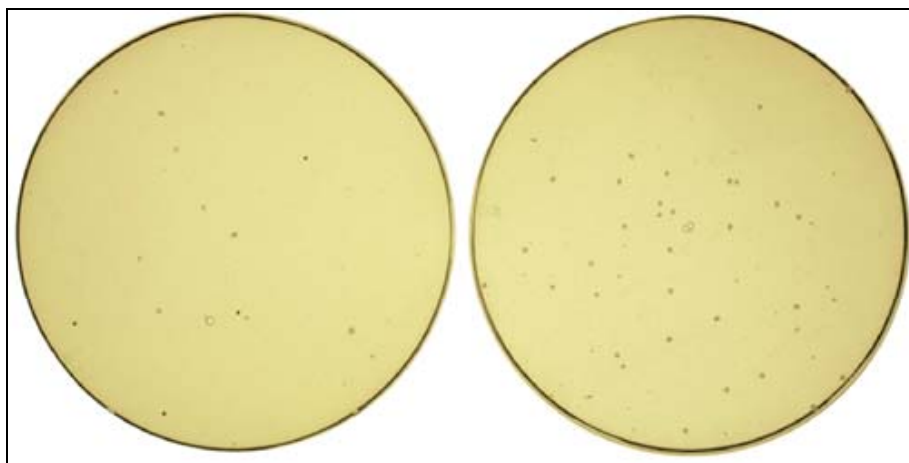


Fig. 12: Résultats du test d'interaction double-hybride entre Maged1 (grand fragment) et p75NTR, avec le gène rapporteur HIS3
Les levures Y190 ont poussé sur milieu SD-Trp-Leu+75mM de 3AT, pendant 10 jours
A gauche : contrôle négatif (pACT2-Maged1+pGBT9) A droite : test (pACT2-Maged1+pGBT9-p75NTR)

En ce qui concerne le petit fragment de Maged2, le bruit de fond était quasiment nul dans le contrôle négatif (pACT2-Maged2+pGBT9). La présence additionnelle de p75NTR a permis à 49 colonies de pousser (Fig. 13). Par contre, le grand fragment de Maged2 a donné un résultat négatif (aucune colonie n'a poussé), que p75NTR soit présent ou non (données non montrées).

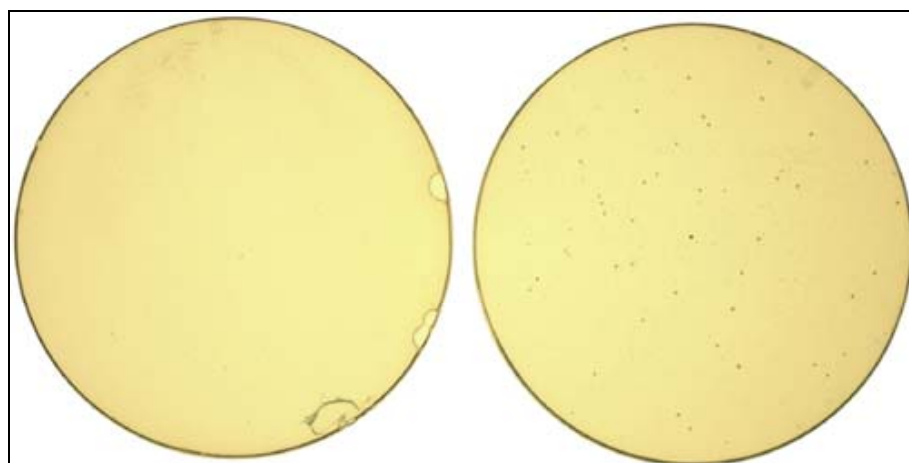


Fig. 13 : Résultats du test d'interaction double-hybride entre Maged2 (petit fragment) et p75NTR, avec le gène rapporteur HIS3
Les levures Y190 ont poussé sur milieu SD-Trp-Leu+ 75mM de 3AT, pendant 10 jours
A gauche : contrôle négatif (pACT2-Maged2+pGBT9) A droite : test (pACT2-Maged2+pGBT9-p75NTR)

Tableau 3 : Récapitulatif des résultats du double-hybride entre Maged1 /d2 et p75NTR, avec le gène rapporteur HIS3

Proie			Appât	
			pGBT9	pGBT9-p75NTR
	pACT2			-
pACT2-Maged1	petit		+/-	+
	grand		+/-	+
pACT2-Maged2	petit		-	+
	grand		-	-

1.3 Discussion et perspectives

L'interaction entre Maged1 et p75NTR est bien connue, et a été démontrée par plusieurs techniques (Salehi et al, 2000). Nous avons essayé de mettre cette interaction en évidence par la méthode du double-hybride dans la levure, en utilisant les gènes rapporteurs LacZ et HIS3 de la souche Y190. Le gène LacZ n'a pas été activé, car aucune activité de la β -galactosidase n'a pu être mise en évidence, malgré l'utilisation de différentes techniques, dont une réputée très sensible.

Le gène HIS3 semblerait avoir été activé, mais il est impossible de l'affirmer avec certitude. En effet, le nombre de colonies ayant poussé lorsque Maged1 et p75NTR sont présents est faible. La différence entre les contrôles négatifs et les tests correspondant n'est peut-être pas significative.

Dans le système que nous avons utilisé (basé sur GAL4), si les deux gènes

rapporteurs, LacZ et HIS3, sont activés, alors il y a de fortes chances que les deux protéines testées interagissent. Mais si des résultats positifs sont obtenus uniquement pour HIS3 et pas pour LacZ, cela est beaucoup moins concluant. En effet, l'activation du gène rapporteur LacZ est plus discriminante que HIS3, et donne moins de faux positifs.

Dans les quelques colonies ayant poussé sur milieu sans histidine, le gène HIS3 a peut-être été activé grâce à une interaction entre Maged1 et p75NTR, mais on ne peut exclure une expression basale de HIS3, non inhibée par le 3AT.

Donc, soit les protéines ont interagi mais la « reconstruction » du facteur de transcription GAL4 n'a pas permis la transcription du gène LacZ. Soit elles n'ont pas interagi, et aucun des deux gènes n'a été activé, les colonies poussant sur milieu sans histidine étant alors des faux positifs.

Dans son article de 2000, Salehi a montré une interaction entre Maged1 et p75NTR par double-hybride dans la levure, ce qui paraît contradictoire avec nos résultats. Deux raisons pourraient expliquer ce paradoxe. Premièrement, le fragment de Maged1 permettant l'activité de LacZ rapporté par Salehi était tronqué des 65 derniers acides aminés. La présence de cette partie de Maged1 dans nos constructions pourrait rendre la protéine hybride incapable d'interagir avec p75NTR. La deuxième explication possible tient au fait que le rapporteur LacZ utilisé par Salehi est régulé par un promoteur GAL7 (dans la souche PJ694A) alors que dans Y190, LacZ est sous la dépendance d'un promoteur GAL1.

Une éventuelle interaction entre Maged2 et p75NTR a été testée de la même manière que pour Maged1. De nouveau, aucune activité β -galactosidase n'a été détectée, indiquant que la transcription du gène LacZ n'a pas été activée. La transcription du gène HIS3 a eu lieu, mais comme pour Maged1, il est difficile de déterminer si elle était due à une interaction ou si elle a eu lieu de manière basale. Ces résultats ne nous permettent pas de nous prononcer de manière définitive sur l'interaction entre Maged2 et p75NTR. Tout comme pour Maged1, il se peut que l'interaction soit trop faible, ou que les protéines ne se soient pas rencontrées. De plus, une ou plusieurs autres protéines sont peut-être nécessaires à l'interaction. Pour obtenir de meilleurs résultats, on pourrait envisager d'utiliser une souche de levure avec des promoteurs plus sensible, ayant un plus grand nombre d'UAS en amont des gènes rapporteurs, ou encore un autre système de double-hybride.

2. Recherche de partenaires de Maged1

2.1 Crible d'une banque double-hybride

En vue d'identifier de nouveaux partenaires de Maged1, nous avons criblé par double-hybride une banque commerciale. Celle-ci est composée d'ADNc d'embryon de souris (E17) clonés dans un vecteur exprimant l'AD de GAL4 (pGADT7) et prétransformés dans la levure *S. cerevisiae* (souche Y187).

Pour cribler la banque avec Maged1, l'ORF a été clonée dans le vecteur pGBT9. L'entièreté de la séquence codante de *Maged1* a été amplifiée par PCR sur de l'ADNc de cerveau de souris, avec les oligos ODB171 et ODB173 flanqués de sites EcoRI. Le fragment a été cloné dans pCRII, séquencé et sous-cloné dans pGBT9.

Le plasmide pGBT9-*Maged1* a alors servi à transformer la levure Y190. Une colonie sélectionnée sur milieu sans tryptophane a servi à inoculer du milieu liquide SD-Trp, qui a été incubé une nuit à 30°C.

Les cellules obtenues ont ensuite été mise à conjuguer avec un aliquot de culture de la librairie ($4,9 \cdot 10^7$ cellules). La souche Y187 de la librairie ayant le « type sexuel » α et Y190 le « type sexuel » a, les deux souches peuvent « s'accoupler ». Après ce croisement, les levures ont été étalées sur des boîtes de milieu SD-Trp-Leu-His, de manière à sélectionner les ex-conjugants ($TRP^+ LEU^+$) dans lesquels le gène rapporteur HIS3 est transactivé (HIS^+). Ces colonies $TRP^+ LEU^+ HIS^+$ ont été repiquées et testées pour leur activité β -galactosidase en coulant une couche d'agarose contenant du X-gal.

Sur les 380 clones repiqués, 191 se sont colorés en bleu. Les inserts fusionnés avec le GAL4AD présent dans ces colonies ont été amplifiés par PCR (Fig. 14). Les produits PCR ont été purifiés puis séquencés. Un crible BLASTN des séquences présentes dans les banques de données a été réalisé avec les séquences obtenues (57 séquences), ce qui a permis d'identifier des partenaires potentiels de Maged1. Parmi ceux-ci figurait 22 fois la protéine Praja1, un partenaire déjà connu de Maged1. Une vingtaine d'autres protéines ont aussi été identifiées (Tableau 4). Nous nous sommes attardés sur LRP1 (low density lipoprotein receptor-related protein 1), un récepteur membranaire (tout comme p75), qui nous paraissait intéressant. Le fragment identifié correspondait à une partie de la queue cytoplasmique de LRP1.

Curieusement, pour ce candidat comme pour d'autres, le fragment d'ADNc ne se trouvait pas dans la même phase de lecture que le segment spécifiant GAL4AD dans pGADT7. Ce décalage de phase pourrait cependant ne pas empêcher l'expression de la protéine de fusion (données communiquées par la firme BD qui nous a fourni la bibliothèque d'ADNc). Nous avons donc décidé de vérifier, par double-hybride, l'interaction entre Maged1 et LRP1, en clonant la queue cytoplasmique de LRP1 en phase dans un vecteur exprimant l'AD de GAL4.

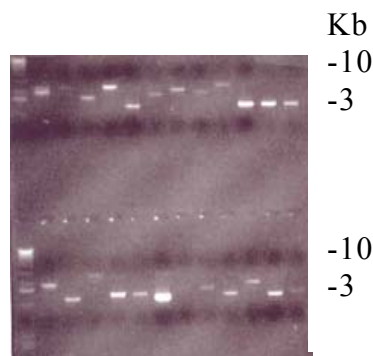


Fig.14 : Photographie après électrophorèse en gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium de produits d'amplification PCR (avec les oligos GAL4AD et pACT23'bis) correspondants aux inserts clonés dans pGADT7 dans différents clones de levure positifs pour le test au X-gal.

Tableau 4 : Candidats identifiés lors du crible double-hybride de Maged1

Candidats	gi	Nombre de clones obtenus lors du crible
Praja 1	14713283/ 2828789	22
Mus musculus RNA binding motif protein 5 (Rbm5 gene)	15528487	1
LA9 mitochondrian	33112617	4
Bcl2 alpha gene, exon 2	468336	1
Carbonic anhydrase 3	12834480/ 192331	2
Clone 1110031L08 produit hypotetical retroviral type aspartic protease contening protein	12835009	1
Pomb 1	7242196	1
DNA sequence from clone RP23-115D24	37606069	1
Mus musculus RIKEN cDNA	34784338	2
Mus musculus brain protein 44 like	19353807	1
Mus musculus programmed cell death 10	18043022	2
Mitochondrial carrier homolog1 (Mtch1)	6468759	1
Praja 2	13435767	1
Mus musculus fetuin (Ahsg) gene	2564198	1
High mobility group box 2 (Hmgb2)	31982287	1
Bos taurus retina protein-coupled receptor kinase 7	17933489	1
Nidogen 1	6754853	1
Translation elongation factor 1 alpha 1	38089918	1
Actin, alpha 1, skeletal muscle	26080631	1
Cox 2	14269443/ 33112617	6
Microsomal signal peptidase 12 kD subunit	26350112	1
Lipoprotein receptor-related protein (LRP1)	15825004	1
Proteasome subunit alpha 7	26353647	1
Non imprinted in Prader Willi/ Angelman syndrom 1	23428875	2

2.2 Vérification de l'interaction entre Maged1 et LRP1 par double-hybride

Pour vérifier l'interaction entre Maged1 et LRP1 en double-hybride, nous avons utilisé la même construction pGBT9-Maged1 que pour le crible et nous avons cloné la queue cytoplasmique de LRP1 en phase avec le domaine d'activation de GAL4 dans le vecteur pACT2.

2.2.1. Construction de pACT2-LRP1

Afin d'amplifier la séquence d'ADN codant pour la queue cytoplasmique de LRP1 (Fig. 7d), une PCR a été réalisée sur de l'ADNc de cerveau de souris, avec les oligos LRP15' et LRP13' (flanqués de sites EcoRI). Le fragment obtenu a été cloné dans pCRII, sa séquence a été vérifiée avant de le sous-cloner dans pACT2 linéarisé par EcoRI.

2.2.2. Test d'interaction double-hybride dans la levure

La construction pACT2-LRP1 a été testée en double-hybride avec Maged1 et Maged2 dans la souche Y190 de *S.cerevisiae*

De façon à vérifier que la présence seule de la proie LRP1 n'active pas les gènes rapporteurs, un contrôle négatif a été intégré dans l'expérience : la construction pACT2-LRP1 a été co-transformée avec le vecteur pGBT9 vide.

De manière à sélectionner la présence des deux plasmides, nous avons fait pousser les levures transformées sur du milieu SD-Trp-Leu.

Pour chaque type de transformation (LRP1+Maged1 et LRP1+Maged2), seize colonies TRP⁺ LEU⁺ ont été repiquées, et une couche d'agarose contenant du X-gal a été coulée sur les boîtes. Aucune colonie n'a pris la coloration bleue, indiquant que la transcription du gène LacZ n'a pas été activée.

Tableau 5 : Activité LacZ déterminée par un test au X-gal
- : Les levures n'ont pas pris la coloration bleue
+ : Les levures ont pris la coloration bleue

Proie		Appât			
		pGBT9	pGBT9-d1	pGBT9-d2	pVA3
	pACT2-LRP1*	-	-	-	
	pTD1				+

* l'expérience a été réalisée avec deux clones indépendants de la construction pACT2-LRP1.

2.3 Discussion et perspectives

Le crible double-hybride d'une banque avec un appât Maged1 a permis d'identifier 24 candidats potentiels. De manière inattendue, les séquences clonées dans pGADT7 étaient souvent hors phase par rapport au domaine d'activation de GAL4. Parmi les protéines identifiées se trouvait Praja1, une protéine connue comme interagissant avec Maged1. L'identification d'un partenaire déjà décrit nous permet d'être confiants quant aux résultats de cette expérience.

Parmi les candidats, nous avons décidé de nous intéresser à la protéine LRP1. LRP1 est un récepteur membranaire capable de transduire un signal. Or on sait que Maged1 interagit avec p75NTR, qui est également un récepteur membranaire impliqué dans la transduction d'un signal. p75NTR active la JNK, qui est une MAPK. Or la queue cytoplasmique de LRP1 interagit avec des protéines ayant un rôle dans l'activation de la voie des MAPK. Maged1 pourrait donc interagir avec la partie cytoplasmique de LRP1 et être impliquée dans sa voie de signalisation.

Après avoir cloné la queue cytoplasmique de LRP1 en phase avec le domaine d'activation de GAL4, nous l'avons testé avec Maged1 en double-hybride. La présence de LRP1 et Maged1 dans la levure n'a pas permis de reconstituer le facteur de transcription GAL4 et d'activer la transcription du gène rapporteur LacZ, suggérant que les deux protéines n'interagissent pas.

La colonie qui s'est colorée en bleu lors du crible et dont on a isolé la séquence codant pour la queue cytoplasmique de LRP1 correspondait peut-être à un faux positif. En effet, le double-hybride est une technique présentant l'inconvénient de donner beaucoup de faux positifs. Dans certains cas, cela peut être dû à une capacité de transactivation des gènes rapporteurs par la protéine appât ou proie, l'initiation de la transcription n'étant alors pas due à une reconstruction de GAL4. Mais dans le cas qui nous occupe, aucune de nos deux protéines n'est capable de transactivation. En effet, la capacité de transactivation des gènes rapporteurs de Maged1 a évidemment été testée avant son utilisation pour le crible, et LRP1 a été testé avec le vecteur pGBT9 vide (contrôle négatif). Il se peut que le peptide résultant du décalage de phase interagisse avec Maged1 et permette ainsi la transactivation des gènes rapporteurs HIS3 et LacZ.

Nous avons donc décidé de ne pas poursuivre nos investigations avec ce candidat.

En vue d'isoler d'autres candidats, l'analyse des résultats du crible se poursuit, par PCR sur les colonies bleues, séquençage et analyse par BLAST.

Lors d'un crible double-hybride réalisé avec *Maged3* dans le cadre d'un précédent travail de mémoire, la protéine BRF1 a été identifiée en tant que partenaire potentiel de Maged3. BRF1 est un facteur de transcription à structure en doigt de zinc encodé par un membre de la famille de gènes appelée « TIS11 family of early response genes ». Les protéines TIS11 lient la protéine 14-3-3. Or celle-ci est impliquée dans la voie de signalisation de p75NTR. Il donc serait intéressant de tester une éventuelle interaction entre Maged1 et BRF1.

3. Recherche de partenaires de Maged2

3.1 Crible d'une banque double-hybride

Actuellement, la protéine Maged2 est peu connue. Aucun partenaire n'a été identifié et on ne sait rien de sa fonction.

Afin d'identifier des protéines interagissant avec Maged2, nous avons criblé avec un appât Maged2 la même banque d'ADNc que celle qui a été criblée avec l'appât Maged1 (ADNc d'embryon E17 de souris). L'appât utilisé était la protéine Maged2 entière fusionnée avec le domaine de liaison à l'ADN de GAL4.

La construction pGBT9-*Maged2* a été transformée dans la levure Y190, puis croisée avec la librairie prétransformée, comme expliqué précédemment. $8,31.10^7$ clones ont été criblés.

Nous avons isolé 30 colonies positives pour le test au X-gal. Des PCR sur l'ADN de ces colonies ont permis d'amplifier les inserts contenus dans pGADT7, et de les séquencer.

Sur les seize séquences obtenues à ce jour, 13 correspondent au gène *gnas*, codant pour la protéine Gs α . Différents clones *gnas* ont été identifiés, certains dont la séquence commence en amont de l'ATG, d'autres en aval (Fig. 15).

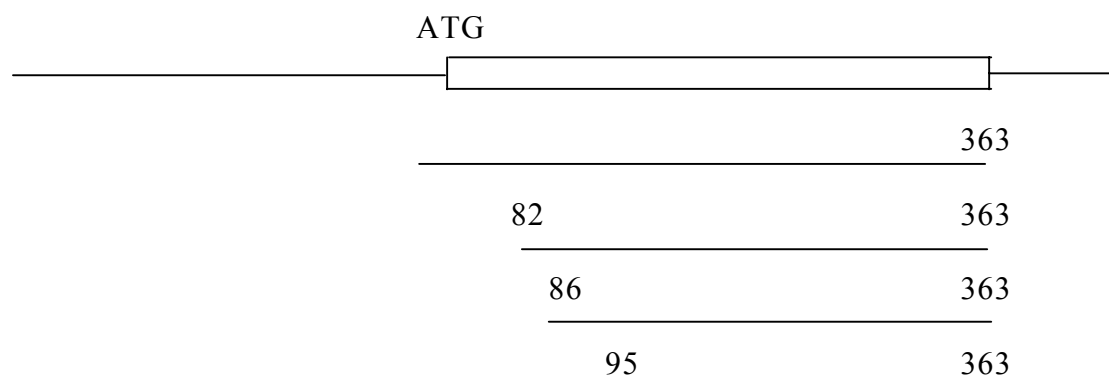


Fig. 15 : Représentation schématique des fragment de l'ADNc de gnas obtenus par PCR sur des colonies positives pour le test X-gal.

3.2 Confirmation de l'interaction entre Maged2 et Gsα en double-hybride

Pour confirmer l'interaction entre Maged2 et Gs α , nous avons réalisé un test double-hybride en utilisant Maged2 comme appât et Gs α comme proie.

Pour *Maged2*, nous avons utilisé la même construction que celle utilisée lors du cribre (pGBT9-*Maged2*).

Nous avons récupéré le plasmide pGADT7- *gnas*₍₉₅₋₃₆₃₎ (Fig. 15) présent dans le clone de levure identifié lors du crible. Pour ce faire, nous avons transformé l'ADN de levure dans des bactéries E.coli DH11 α . Le gène de résistance à l'ampiciline de pGADT7 nous a permis de sélectionner les bactéries hébergeant les plasmides dérivés de ce vecteur.

Des PCR ont été réalisées sur les colonies Amp^R obtenues afin d'identifier celles ayant intégré les plasmides pGADT7-*gnas*₍₉₅₋₃₆₃₎. De l'ADN a été préparé à partir de ces colonies puis séquencé.

Le clone pGADT7-*gnas*₍₉₅₋₃₆₃₎ a été testé avec *Maged2* et également avec *Maged1* clonés dans pGBT9. Un contrôle positif (pVA3+pTD1) et un contrôle négatif (pGADT7-GNAS+pGBT9) ont été inclus.

Après sélection sur milieu SD-Trp-Leu, des colonies ont été repiquées et une couche d'agarose avec du X-gal a été coulée sur les boîtes (Fig. 16).

Les colonies du contrôle positif ont bien viré au bleu et celles du contrôle négatif sont restées blanches.

Les colonies transformées avec pGBT9-*Maged2* et pGADT7-*gnas* se sont colorées en bleu, ce qui confirme l'interaction mise en évidence lors du crible.

Par contre, les colonies transformées avec pGBT9-*Maged1* et pGADT7-*gnas* sont restées blanches, indiquant que les deux protéines n'ont pas interagi.

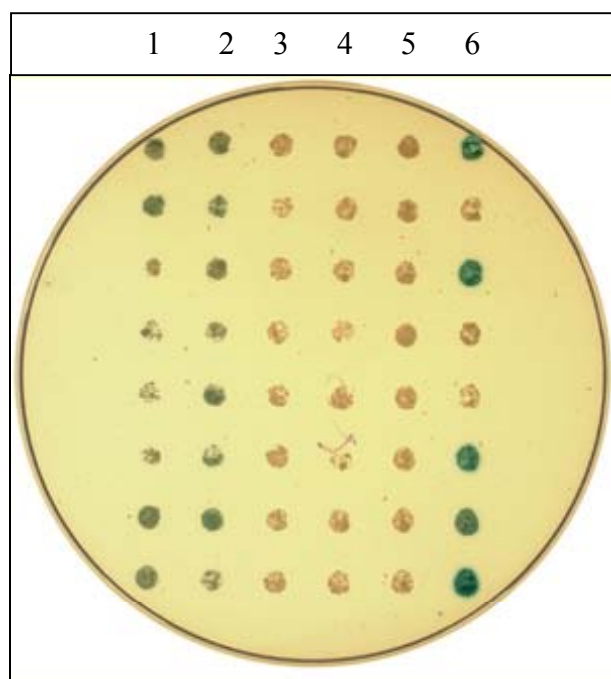


Fig 16 : Résultat du double-hybride entre *Maged2* et *gnas* et *Maged1* et *gnas*, avec le gène rapporteur *LacZ*
Les levures Y190 ont poussé sur milieu SD-Trp-Leu, pendant 1 semaine. Après réplique, une couche de X-gal a été coulée
1 et 2 : *Maged2* et *gnas*
3 et 4 : *Maged1* et *gnas*
5 : contrôle négatif
6 : contrôle positif

3.3 Confirmation de l'interaction entre Maged2 et Gs α in vitro

Nous avons ensuite testé l'interaction entre Maged2 et Gs α par co-immunoprécipitation de ces deux protéines produites par transcription-traduction *in vitro*.

La séquence codante de *gnas* a été clonée dans le vecteur pcDNA3/*myc*-HisA (Fig. 17). Cette séquence a été amplifiée par PCR à partir d'ADNc de cerveau de souriceau, avec des oligos flanqués de sites XbaI. Le fragment PCR a été cloné dans pCRII, puis sous-cloné dans le site XbaI de pcDNA3/*myc*-HisA, en phase avec l'épitope myc en position carboxy-terminale.

Nous disposons d'une construction de Maged2 cloné dans pcDNA3/His.

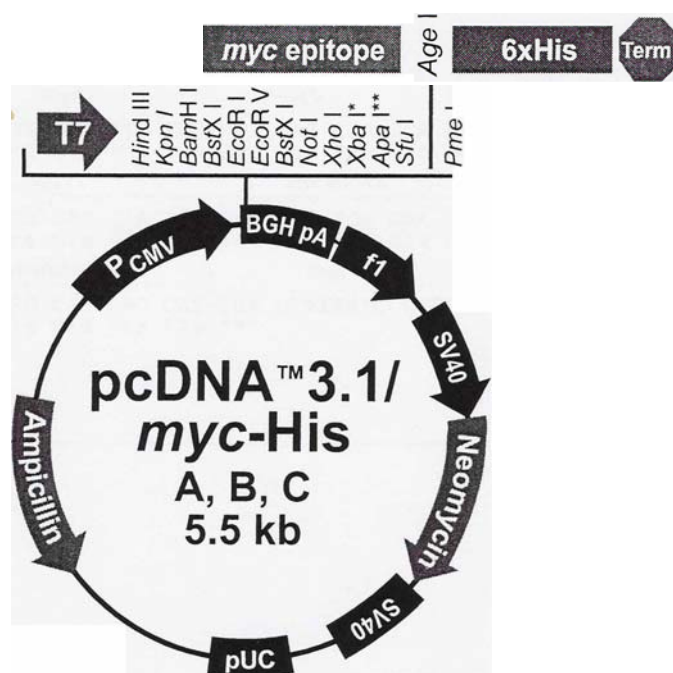


Fig. 17 : Carte du vecteur pcDNA3/*myc*-His

Les protéines Gs α et Maged2 ont été produites par transcription-traduction *in vitro*, en présence de ³⁵S-méthionine. Pour vérifier que les protéines avaient bien été produites, nous avons analysé les produits de réaction par SDS-page et autoradiographie. Dans la piste 1 de la figure 18, on observe une bande correspondant à Maged2, dont le poids moléculaire attendu est de 65 kD. Dans la piste 2, une des bandes que l'on peut observer correspond au poids moléculaire de Gs α (41,8 kD).

Nous avons alors tenté de co-immunoprécipiter ces protéines produites *in vitro*. Pour ce faire, nous avons incubé les deux protéines pendant une nuit en présence d'anticorps anti-myc. Des billes de protéines G-agarose ont ensuite été ajoutées. Les protéines G ont la particularité de lier le fragment Fc des IgG. L'anti-myc doit donc s'y lier, tirant avec lui la protéine de fusion Gs α -myc. Si Maged2 et Gs α interagissent, Maged2 reste lié aux billes par l'intermédiaire de Gs α .

Un contrôle négatif a été inclus, dans lequel nous avons mis la protéine Maged2 seule (avec l'anti-myc et les billes), de manière à vérifier que celle-ci ne se lie pas de manière non spécifique aux billes ou à l'anti-myc.

Les pistes 3 et 4 de la figure 18 montrent les résultats obtenus.

+	-	+	+	Maged2
-	+	-	+	Gs α -myc
-	-	+	+	Anti-myc

kD

-100

Maged2 →

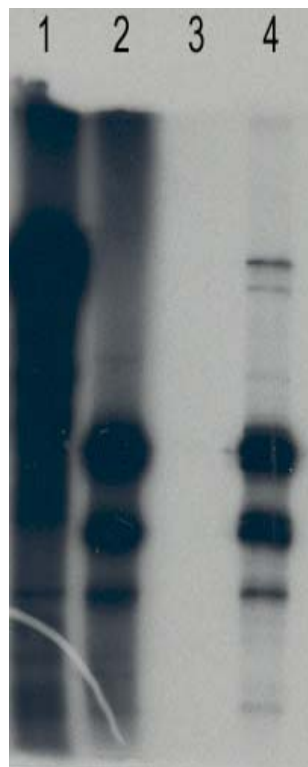
-50

Gsα →

-37

Fig 18 : Autoradiographie après électrophorèse d'un gel de polyacrylamide montrant les produits de transcription-traduction in vitro Maged2 et Gsα ainsi que les produits de la co-immunoprécipitation de ces 2 protéines.

*1 : produit transcription-traduction in vitro Maged2
2 : produit transcription-traduction in vitro Gsα
3 : co-Ip : contrôle négatif
4 : co-Ip : Maged2 + Gsα*



Aucune bande n'est apparue dans la piste correspondant au contrôle négatif (piste 3). Dans la piste correspondant à la co-immunoprécipitation entre Maged2 et Gsα (piste 4), on peut voir une bande correspondant à Gsα. Une bande correspondant à Maged2 est également présente, ce qui confirme l'existence d'une interaction spécifique entre Maged2 et Gsα.

3.4 Confirmation de l'interaction entre Maged2 et Gsα in vivo

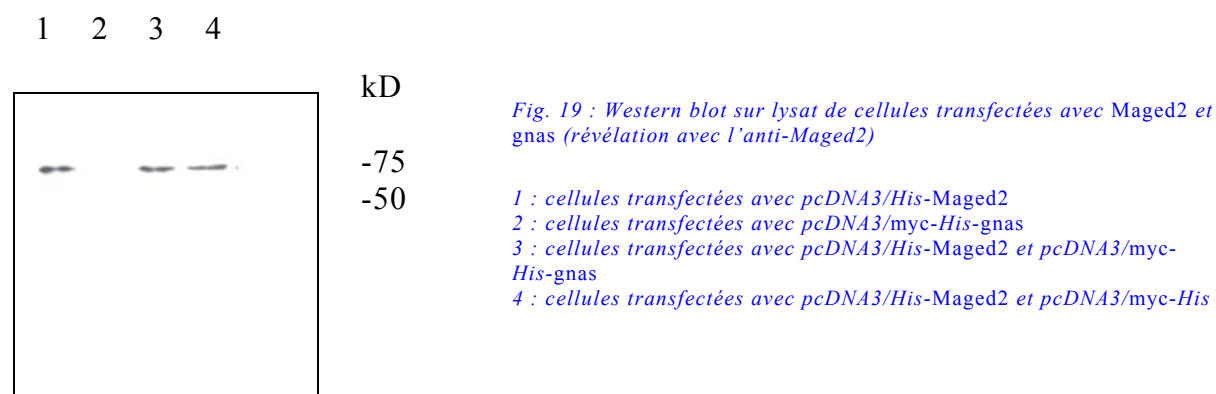
En vue de confirmer l'interaction entre Maged2 et Gsα par co-immunoprécipitation des protéines produites *in vivo*, nous avons tenté de transfecter des cellules avec les deux gènes correspondants.

Les vecteurs d'expression Maged2 et Gsα utilisés dans l'expérience de co-immunoprécipitation décrite plus haut ont servi à transformer des cellules COS.

Trois types de transfections ont été réalisées. Deux transfections simples (une avec Maged2 et l'autre avec *gnas*) et deux co-transfections (l'une avec Maged2 et *gnas* et l'autre avec Maged2 et le vecteur pcDNA3/myc-His sans insert).

Afin d'analyser l'expression de Maged2 et de Gsα, un western blot a été réalisé sur les lysats cellulaires.

La figure 19 montre que Maged2 a bien été surexprimé dans les cellules transfectées (pistes 1, 3 et 4).



Par contre, la surexpression de Gsα-myc n'a pas donné le résultat attendu. En effet, l'anti-myc n'a révélé aucune bande correspondant à la taille attendue de Gsα-myc (données non montrées). Nous avons vérifié le bon fonctionnement de l'anticorps anti-myc sur une protéine témoin contenant cet épitope (donnée non montrée). Pour voir si ce résultat négatif ne provenait pas de l'épitope myc contenu dans le vecteur pcDNA3/myc-His, nous avons séquencé ce dernier. La séquence de l'épitope était bien en phase avec celle de *gnas*. Nous avons alors utilisé un anticorps anti-Gsα pour révéler la présence de Gsα-myc et de la protéine Gsα endogène. La figure 20 montre que Gsα est abondamment exprimée de manière endogène dans les cellules COS. En effet, des bandes identiques sont présentes dans toutes les pistes, qu'elles correspondent à du lysat de cellules transfectées ou non avec *gnas*.

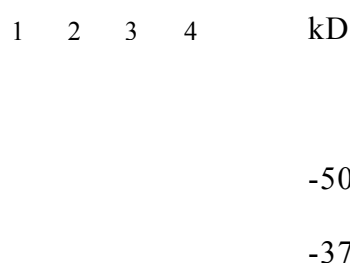
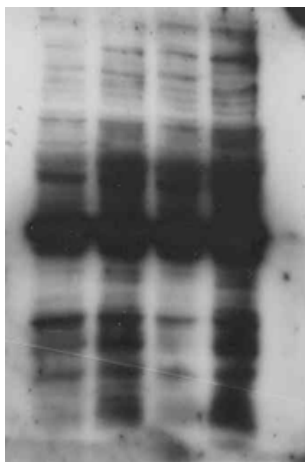


Fig. 20 : Western blot sur lysat de cellules transfectées avec Maged2 et gnas (révélation avec l'anti-Gsa)

- 1 : cellules transfectées avec pcDNA3/His-Maged2
- 2 : cellules transfectées avec pcDNA3/myc-His-gnas
- 3 : cellules transfectées avec pcDNA3/His-Maged2 et pcDNA3/myc-His-gnas
- 3 : cellules transfectées avec pcDNA3/His-Maged2 et pcDNA3/myc-His



3.5 Discussion et perspectives

Le crible d'une banque double-hybride avec un appât Maged2 nous a permis d'isoler de nombreux clones indépendants contenant un fragment d'ADNc *gnas*, codant pour la protéine Gsa. L'interaction entre Maged2 et Gsa a été confirmée en double-hybride, ainsi que par une expérience de co-immunoprécipitation des ces protéines produites par transcription-traduction *in vitro*.

Pour confirmer l'interaction entre des protéines exprimées par des cellules, nous avons réalisé une transfection transitoire de cellules COS. Les cellules ont bien surexprimé Maged2. Nous n'avons pas pu exprimer une version de Gs α marquée par un épitope myc dans des cellules, cependant le niveau d'expression de Gs α endogène pourrait être suffisant pour réaliser une co-immunoprécipitation. Celle-ci pourrait donc se faire sur des cellules transfectées uniquement avec Maged2. Le lysat devra alors être immunoprécipité par l'anticorps anti-Gs α . La révélation du western blot se fera avec l'anti-Maged2 de manière à détecter sa présence dans le complexe protéique associé à Gs α .

Il serait également intéressant de tester quels sont les domaines de ces deux protéines impliqués dans l'interaction, et d'étudier la signification fonctionnelle de cette interaction.

4. Conclusion

Un crible double-hybride dans la levure a été réalisé avec un appât Maged1, dont plusieurs partenaires sont déjà connus. L'interaction entre Maged1 et la protéine Praja1 a été confirmée lors de ce crible. Parmi les candidats se trouvait également la protéine LRP1, mais l'interaction avec Maged1 n'a pas pu être confirmée.

La protéine Maged2 est mal connue, et aucun partenaire n'a été décrit à ce jour. Nous avons testé une éventuelle interaction entre Maged2 et p75NTR, un partenaire connu de Maged1. Les résultats suggèrent mais ne démontrent pas une telle interaction. Un crible double-hybride nous a permis d'identifier Gs α en tant que partenaire de Maged2. Cette interaction a été confirmée par co-immunoprécipitation *in vitro*. Sa signification fonctionnelle reste à explorer.

MATERIEL ET METHODES

1. DOUBLE-HYBRIDE

1.1 Construction de pACT2-*d1/d2*, pGBT9-p75, pACT2-LRP1

1.1.1. Insertion de *Maged1*, *Maged2*, p75NTR et LRP1 dans pCRII

1.1.1.1. PCR sur DNA

Faire PCR dans 50 µl.

Mix

5 µl tampon2 (10x concentré)

5 µl dNTP (2mM)

5 µl amorce 1 (10µM)

5 µl amorce 2 (10µM)

0.5 µl enzyme High Fidelity (Roche)

	<i>d1</i> (232-173)	<i>d1</i> (231-173)	<i>d2</i> (233-176)	<i>d2</i> (234-176)	<i>p75</i>	<i>LRP1</i>
<i>ADN</i>	1µl pCRII- <i>d1</i> (171-173)	1µl pCRII- <i>d1</i> (171-173)	1µl pGBT9- <i>d2</i>	1µl pGBT9- <i>d2</i>	1µl cDNA de cerveau E19	5µl cDNA Adulte
<i>Amorce 1</i>	ODB232	ODB231	ODB233	ODB234	ODB230	Lrp1 5'
<i>Amorce 2</i>	ODB173	ODB173	ODB176	ODB176	ODB181	Lrp1 3'
<i>Programmes</i>	3' à 94°C 30" à 94°C 1' à 55°C 2' à 68°C 5' à 68°C x 20	3' à 94°C 30" à 94°C 1' à 62°C 3' à 68°C 5' à 68°C x 15	5' à 94°C 1' à 94°C 1' à 55°C 3' à 68°C 5' à 68°C x 20	3' à 94°C 30" à 94°C 1' à 62°C 3' à 68°C 5' à 68°C x 15	3' à 94°C 30" à 94°C 1' à 62°C 3' à 68°C 5' à 68°C x 30	3' à 94°C 30" à 94°C 30" à 55°C 1' à 68°C 5' à 68°C x 20

1.1.1.2. Clonage dans pCRII (protocole et solutions du TA cloning Kit, Invitrogen)

Réaction de ligation

Incuber O.N. à 14°C : 5 µl d'eau stérile, 1 µl de tampon de ligation 10X, 2 µl de vecteur pCRII (25 ng/µl), 1 µl de produit PCR, 1 µl de T₄ DNA ligase

Transformation (choc thermique)

- . Ajouter 2 µl de produit de ligation à un tube de bactéries E.Coli INVαF'
- . Incuber 30 min sur glace, 30 s à 42°C, 2 min sur glace
- . Ajouter 450 µl de LB. Incuber 1 heure à 37°C
- . Etaler 100 µl sur boîtes LBA (ampiciline 100µg/ml) + X-gal. Incuber O.N. à 37°C

1.1.1.3. Isolation des clones d'intérêt par PCR

- . Reprendre plusieurs colonies dans 50 µl d'eau chacune, vortexer.
- . Réaliser une PCR sur 2 µl de colonie en suspension, avec 18 µl de mix

1.1.2. Insertion de *d1*, *d2* et LRP1 dans pACT2 et de p75 dans pGBT9

1.1.2.1. Récupération des inserts et linéarisation des plasmides

Digestion de pCRII+insert et linéarisation de pACT2 et pGBT9 par EcoRI

	<i>pCRII-d1</i> (231-173)	<i>pCRII-d1</i> (232-173)	<i>pCRII-d2</i> (233-176)	<i>pCRII-d2</i> (234-176)	<i>pCRII</i> -p75	<i>pCRII</i> - LRP1	<i>pACT2</i>	<i>pGBT</i> 9
<i>DNA</i>	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	20 µl	10 µl	10 µl	10 µl
<i>ECORI</i>	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
<i>Tampon 3</i>	10 µl	5 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
<i>Eau</i>	78 µl	33 µl	78 µl	78 µl	68 µl	78 µl	78 µl	78 µl

Récupération des inserts

- Déposer le produit de digestion sur gel d'agarose
- Découper la bande correspondant à l'insert

Purification des inserts

(protocole et solutions du kit Wizard SV Gel and PCR Clean up System, Promega)

- Dissoudre le fragment de gel dans de la Membrane Binding Solution (10 µl par 10 mg de gel) à 60° C.
- Transférer dans une mini-colonne insérée dans un tube collecteur. Incuber 1 min à TA
- Centrifuger 1 min à 10.000 g, décanter.
- Laver la colonne avec 700 µl de Membrane Wash Solution
- Centrifuger 1 min à 10.000 g, décanter
- Laver la colonne avec 500 µl de Membrane Wash Solution
- Centrifuger 5 min à 10.000 g, décanter
- Transférer la mini-colonne dans un Eppendorf
- Ajouter 50 µl d'eau Nuclease-free. Incuber 1 min à TA.
- Centrifuger 1 min à 10.000 g

Déphosphorylation par la CIP des vecteurs linéarisés et purification par extraction au phénol et précipitation à l'alcool

- Ajouter 1 µl de CIP à 100 µl de vecteur et incuber 60 min à 37° C
- Ajouter 1 µl d'EDTA 500 mM et incuber 10 min à 65°C
- Ajouter 100 µl de phenol-CIAA, vortexer, centrifuger 15 min
- Reprendre la phase aqueuse et y ajouter : 10 µl NaAc 3M et 500 µl éthanol
- Incuber 60 min à -70°C
- Centrifuger 15 min à 14.000 rpm, décanter, rincer avec 500 µl d'éthanol 70%
- Sécher le culot et le resuspendre dans 10 µl d'eau.

1.1.2.2. Ligation de *d1*, *d2* et LRP1 dans pACT2 et de *p75* dans pGBT9

	<i>d1</i> (231-173)	<i>d1</i> (232-173)	<i>d2</i> (233-176)	<i>d2</i> (234-176)	<i>p75</i>	<i>LRP1</i>
<i>Vecteur linéarisé et déphosphorylé</i>	2 µl	1 µl	1 µl	2 µl	1 µl	1 µl
<i>Insert</i>	15 µl	16 µl	5 µl	10 µl	16 µl	16 µl
<i>Tampon de ligation</i>	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
<i>T4 DNA ligase</i>	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
<i>Eau</i>	-	-	11 µl	5 µl	-	-

Incuber O.N. à 14° C.

1.1.2.3. Transformation de la ligation dans les bactéries

Transformation d'E.Coli DH11α électrocompétentes

Pour d1 (232-173) / d2 (234-176) / p75 et LRP1

- . Ajouter 2 µl de produit de ligation à 40 µl de cellules électrocompétentes
- . Transférer dans une cuvette à électroporation. Réaliser l'électroporation
- . Ajouter 450 µl de LB. Incuber 1 heure à 37°C
- . Étaler sur boîte LBA. Incuber O.N. à 37°C

Transformation d'E.Coli omniMAX-T1 thermocompétentes

Pour d1 (231-173) et d2 (233-176)

- . Ajouter 2 µl de produit de ligation aux cellules omniMAX-T1
- . Incuber 30 min sur glace, 30 s à 42° C, 2 min sur glace
- . Ajouter 250 µl de LB. Incuber 1 heure à 37°C
- . Étaler 100 µl sur boîte LBA. Incuber O.N. à 37°C

1.1.2.4. Détection des clones d'intérêt par PCR

- . Reprendre plusieurs colonies dans 50 µl d'eau chacune
- . Réaliser une PCR sur 2 µl de colonie en suspension, avec 18 µl de mix (avec une amorce du vecteur et une amorce de l'insert)

Mix

- 2 µl tampon
- 2 µl dNTP
- 2 µl amorce 1
- 2 µl amorce 2
- 0.4 µl DNA polymérase (Biotools)
- 9.6 µl d'eau

	<i>d_l</i> (231-173)	<i>d₁</i> (232-173)	<i>d₂</i> (233-176)	<i>d₂</i> (234-176)	<i>p75</i>	<i>LRP1</i>
<i>Amorce 1</i>	pACT2 5'	pACT2 5'	pACT2 5'	pACT2 5'	DNAB5'	pACT2 5'
<i>Amorce 2</i>	ODB79	ODB90	PCH079	PCH082	ODB181	LRP1 3'
<i>Programmes</i>	<div style="text-align: right;"> 3' à 94° C 1' à 94° C 1' à 57° C 1' à 72° C 5' à 72° C <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> } x 30 </div> </div>					

1.1.2.5. Mini préparation d'ADN plasmidique

Cfr 1.1.1.4

1.1.2.6. Séquençage

Oligos :

PACT2-*d_l*(231-173), pACT2-*d₁*(232-173), pACT2-*d₂*(233-176), pACT2-*d₂*(234-176) : pACT2 5' et pACT2 3'bis

pGBT9-p75 : 5'DNABD et 3'DNABD

pACT2-LRP1 : pACT2 5'

1.2 Transformation de la levure

- . Inoculer quelques colonies Y190 dans 1 ml de YPD, vortexer
- . Transférer dans un erlen contenant 50 ml de YPD
- . Incuber O.N. à 30°C en agitant (la DO₆₀₀ doit atteindre plus de 1,5)
- . Transférer 30 ml de culture dans un erlen contenant 300 ml de YPD (la DO₆₀₀ doit être de 0,2 - 0,3)
- . Incuber 3 heures à 30°C en agitant (la DO₆₀₀ doit être de 0,4-0,6)
- . Diviser la culture dans des flacons de 50 ml et centrifuger 5 min à 1.000 g
- . Décanter les surnageants et resuspendre les culots dans 5 ml d'eau chacun. Pooler les cellules en un seul tube.
- . Centrifuger 5 min à 1.000 g, décanter le surnageant
- . Resuspendre le culot dans 1,5 ml de 1XTE/1XLiAc fraîchement préparé
- . Dans un Eppendorf, mettre 0,1 µg d'ADN plasmidique et 0,1 mg de DNA carrier dénaturé.
- . Ajouter 0,1 ml de suspension de levure et vortexer
- . Ajouter 0,6 ml de PEG/LiAc (8 ml PEG 10%, 1 ml TE 10X, 1ml LiAc10X) et vortexer
- . Incuber 30 min à 30°C en agitant
- . Ajouter 70 µl de DMS0, mélanger par inversion (ne pas vortexer)
- . Incuber 15 min à 42° C et 2 min sur glace. Centrifuger 5 s à 14.000 rpm.
- . Décanter le surnageant. Resuspendre le culot dans 1 ml d'eau

- . Etaler 200 µl sur boîte contenant milieu sélectif
- . Incuber quelques jours à 30°C.

1.3 Mise en évidence de l'activité β -galactosidase

1.3.1. En coulant l'X-gal sur boîte

- a) Repiquer les colonies sur une nouvelle boîte
Mettre 100 µl de milieu adéquat dans les puits d'une plaque multi-puits
Y ajouter les colonies. Incuber quelques heures à 30°C
Avec un hérisson, repiquer les colonies sur boîte avec milieu adéquat
Incuber quelques jours à 30°C.
- b) Préparer le X-gal :
Dissoudre 50 mg d'agarose dans 5 ml d'eau (en chauffant)
Ajouter : 5 ml NaPO₄ 0,5M pH7
 0,6 ml diméthylformamide
 100 µl SDS 10%
 200 µl X-gal 2%
- c) Verser 10 ml sur chaque boîte
- d) Incuber quelques heures à 30°C.

1.3.2. En utilisant l'ONPG comme substrat (Clontech, Yeast Protocols Handbook)

- . Inoculer une colonie dans 5 ml de milieu sélectif, vortexer
- . Incuber O.N. à 30°C en agitant
- . Vortexer la culture et transférer 2 ml dans 8 ml de YPD
- . Incuber 3 à 5 heures à 30° C en agitant, jusqu'à ce que la DO₆₀₀ atteigne 0,5-0,8.
Noter la D.O.
- . Placer 1,5 ml de culture dans 3 tubes Eppendorf.
- . Centrifuger 30 s à 14.000 rpm, décanter
- . Ajouter 1,5 ml de Z Buffer à chaque tube et vortexer
- . Centrifuger 30 s à 14.000 rpm, décanter et resuspendre dans 300 µl de Z buffer
- . Transférer 0,1 ml de suspension cellulaire dans des nouveaux tubes Eppendorf
- . Placer les tubes dans l'azote liquide pour congeler les cellules
- . Placer les tubes dans un bain à 37°C pour dégelier les cellules
- . Recommencer 2 fois ce cycle de congélation/décongélation
- . Préparer un tube « blanc » avec 100 µl de Z buffer
- . Ajouter 0,7 ml de Z buffer + β -mercaptoéthanol (100 ml Z buffer + 270 µl β -mercaptoéthanol) à tous les tubes (« blanc » compris).
- . Ajouter 160 µl d'ONPG dans du Z buffer (4mg ONPG/ml Z buffer) à tous les tubes et mettre en route le chronomètre.
- . Incuber les tubes à 30°C
- . Quand la coloration jaune apparaît, ajouter 0,4 ml de Na₂CO₃ 1M.
- . Noter le temps écoulé
- . Centrifuger les tubes « tests » 10 min à 14.000 rpm
- . Transférer le surnageant dans une cuvette de spectrophotomètre

- . Calibrer le spectrophotomètre sur 0 avec le blanc et mesurer la DO₄₂₀ des échantillons. La DO doit être entre 0,02 et 1,0
- . Calculer les unités de β -galactosidase par la formule suivante :

$$\text{Unités } \beta\text{-gal} = \frac{1000 \times \text{DO}_{420}}{t \times V \times \text{DO}_{600}} \quad \text{où } t = \text{temps d'incubation et } V = 0,5$$

1.3.3. En utilisant le CPRG comme substrat

- . Inoculer une colonie dans 5 ml de milieu sélectif, vortexer
- . Incuber O.N. à 30°C en agitant
- . Vortexer la culture et transférer 2 ml dans 8 ml de YPD
- . Incuber 3 à 5 heures à 30°C en agitant, jusqu'à ce que la DO₆₀₀ soit de 0,5-0,8. Noter la D.O.
- . Placer 1,5 ml de culture dans 3 tubes Eppendorf
- . Centrifuger 30 s à 14.000 rpm, décanter.
- . Ajouter 1 ml de Buffer 1 à chaque tube et vortexer
- . Centrifuger 30 s à 14.000 rpm, décanter et resuspendre dans 300 μ l de Buffer 1
- . Transférer 0,1 ml de suspension cellulaire dans des nouveaux tubes Eppendorf
- . Placer les tubes dans l'azote liquide pour congeler les cellules
- . Placer les tubes dans un bain à 37°C pour dégeler les cellules
- . Recommencer 2 fois ce cycle de congélation/décongélation
- . Préparer un tube « blanc » avec 1 ml de Buffer 2
- . Ajouter 0,7 ml de Buffer 2 à tous les tubes (sauf blanc). Mettre en route le chrono
- . Incuber les tubes à 30°C
- . Lorsque la coloration rouge-orangé apparaît, ajouter 0,5 ml de ZnCl₂ 3mM
- . Noter le temps écoulé
- . Centrifuger les tubes « tests » 10 min à 14.000 rpm
- . Transférer le surnageant dans une cuvette de spectrophotomètre
- . Calibrer le spectrophotomètre sur 0 avec le blanc et mesurer la DO₅₇₈ des échantillons. La DO doit être entre 0,25 et 1,8
- . Calculer les unités de β -galactosidase par la formule suivante :

$$\text{Unités } \beta\text{-gal} = \frac{1000 \times \text{DO}_{578}}{t \times V \times \text{DO}_{600}} \quad \text{où } t = \text{température d'incubation et } V = 0,5$$

2. Co-immunoprécipitation à partir de protéines produites par TNT

2.1 Construction de pcDNA3/*myc*-His-*gnas*

- . Réaliser une PCR sur 5 μ l de cDNA de cerveau d'adulte et de souriceau de 10 jours (P10). Faire la PCR dans 50 μ l, avec les oligos GNAS5'XbaI et GNAS3'XbaI, et l'enzyme high fidelity.

Programme :

3 min à 94°C
 30 s à 94°C
 1 min à 55°C
 2 min à 68°C
 5 min à 68°C

} x 20

- . Cloner le produit PCR dans le vecteur pCRII (clonage intermédiaire)
- . Réaliser une PCR sur les colonies obtenues, avec GNAS1824 et F ou R dans 20 µl.

Programme :

3 min à 94°C
 1 min à 94°C
 1 min à 57°C
 2 min à 72°C
 5 min à 72°C

- . Faire une mini préparation pour obtenir l'ADN
- . Séquencer avec F, R, GNAS5', GNAS1106, GNAS1824, GNAS3'
- . Digérer par XbaI pour libérer l'insert

DNA	10 µl	}	2 heures à 37°C
XbaI	2 µl		
Tampon 2	5 µl		
Eau	33 µl		

- . Récupérer l'insert et le purifier.
- . Linéariser le vecteur pCDNA3myc-HisA par XbaI et le digérer à la CIP.
- . Ligner *gnas* dans pCDNA3myc-HisA/Xba/CIP

DNA pCDNA3myc-His/Xba/CIP	1 µl	}	O.N. à 14°C
DNA <i>gnas</i>	12 µl		
Tampon ligation	2 µl		
Ligase	1 µl		
Eau	4 µl		

- . Transformer 5 µl de produit de ligation dans E.Coli omniMAX, étaler 200 µl sur boîtes LBA
- . Faire PCR sur 12 colonies diluées dans 50 µl d'eau chacune, avec les oligos T₇ et GNAS1824.

Programme :

3 min à 94°C
 1 min à 94°C
 1 min à 57°C
 1 min 30 s à 72°C
 5 min à 72°C

} x 30

- . Faire une mini préparation
- . Séquencer avec GAL4AD, pACT23'bis, GNAS5'XbaI, GNAS3'XbaI, GNAS1824, GNAS1106.

2.2 Transcription-traduction in vitro

(protocole et solutions du kit TNT T7 Coupled Reticulocyte lysate System, Promega)

	<i>pcDNA3myc-His-gnas</i>	<i>pcDNA3His-d2</i>
<i>TNT Rabbit Reticulocyte lysate</i>	25 µl	25 µl
<i>Tampon</i>	2 µl	2 µl
<i>T7RNA polymerase</i>	1 µl	1 µl
<i>AA sans méthionine</i>	1 µl	1 µl
<i>Méthionine 35S</i>	2 µl	2 µl
<i>RNasin</i>	1 µl	1 µl
<i>DNA</i>	1 µl	1 µl
<i>Eau nuclease-free</i>	17 µl	17 µl

Incuber 1 h 30 à 30° C.

2.3 SDS-PAGE

6 µl produit TNT
4 µl PBS
10 µl SDS loading buffer

} Bouillir 10 minutes

- Charger 10 µl sur gel 10 % d'acrylamide, faire migrer à 100 V.
- Mettre le gel dans du fixateur (30 % MetOH, 10 % HAc) pendant 30 min en agitant puis dans l'amplify 20 min en agitant. Sécher le gel 1 heure à 80°C.
- Mettre le gel dans une cassette avec un film MR. Exposer O.N. à - 70° C.
- Développer le film.

2.4 Co-Immunoprécipitation

	<i>Test (gnas-d2)</i>	<i>CTL-(d2seul)</i>
<i>Produit TNT gnas</i>	40 µl	-
<i>Produit TNT d2</i>	20 µl	20 µl
<i>Complete(inhibiteur de protease)</i>	10 µl	10 µl
<i>Lysis-buffer NP40</i>	430 µl	470 µl

- Incuber 1 heure sur roue à 4° C.
- Ajouter 1 µg d'anti-Myc (1 mg/ml, Invitrogen).
- Incuber O.N. sur roue à 4°C.
- Ajouter 50 µl de billes protéine G agarose.
- Incuber 3 heures sur roue à 4°C
- Laver 3 fois avec 500 µl de lysis buffer NP40.
- Ajouter SDS loading buffer 2X aux billes. Bouillir 10 min.

- . Charger 10 µl sur gel 10 % d'acrylamide. Faire migrer à 100 V.
- . Mettre le gel 30 min dans fixateur et 20 min dans amplify. Sécher 1 heure à 80°C.
- . Exposer le gel avec un film MR pendant 1 semaine.
- . Développer le film.

3. Transfection de cellules COS

3.1 Transfection des cellules (Lipofectamine 2000, Invitrogene)

Préparation des cellules

Le jour avant la transfection, trypsiniser les cellules (aspirer le milieu, rincer avec 5 ml de DMEM sans sérum, ajouter 600 µl de trypsine EDTA, incubé 5 min à 37° C, ajouter 6 ml de DMEM+FCS+PS).

Compter les cellules dans un hémodécomètre après les avoir centrifugées 5 min à 1.200 rpm. Ensemencer les cellules à raison de $1,5 \times 10^6$ cellules par puits, dans une plaque 6 puits, de façon à ce que les cellules atteignent 90-95 % de confluence le jour de la transfection.

Transfection

Pour chaque puits de cellules à transférer, diluer 4 µg de DNA dans 250 µl de DMEM sans sérum. Diluer également 2 µl de lipofectamine 2000 réactif dans 250 µl de DMEM sans sérum. Incuber 5 min à TA.

Combinaison l'ADN dilué et la lipofectamine diluée et incubé 30 min à TA.

Ajouter les 500 µl de complexe DNA/lipofectamine à chaque puits de cellule.

Incuber ON à 37° C, 5 % CO₂.

3.2 Western blot sur lysat

Récupération du lysat

Aspirer le milieu, ajouter 300µl de lysis buffer NP40+complete. Laisser 10 min à TA. Récupérer dans un Eppendorf et centrifuger 10 min à 14000 rpm. Récupérer le surnageant

Western blot

Ajouter 30µl de SDS loading buffer 2X à 30µl de lysat. Bouillir 5 min

Charger 15µl sur 2 gels 10% d'acrylamide. Faire migrer à 100V

Laisser chaque gel sur une plaque de verre.

Pour chaque gel, tremper la membrane PVDF (Hybond-p de Amersham BIOSCIENCES) dans du méthanol pendant 1 min.

La rincer plusieurs fois dans l'eau puis dans la solution "Anode I".

Venir la mettre sur le gel qui se trouve sur la plaque de verre.

Tremper 3 papiers Whatman dans la solution "Anode I". Les mettre sur la membrane.

Tremper 3 papiers Whatman dans la solution "Anode II". Les mettre sur le montage.

Retourner le montage et tremper 3 papiers Whatman dans la solution "Cathode". Les mettre sur le gel.

Mettre le montage avec les papiers "Cathode" vers le haut dans l'appareil. Fermer le tout et brancher l'appareil sur 225mA pendant 1h.

Bloquer les membranes dans du lait pendant 1h. Laver 3X5 min dans du PBST.

Incuber ON avec 5ml d'anticorps primaire dilué 5000X dans du PBST/1%BSA
 Incuber une membrane avec de l'anti-d2 de lapin
 Incuber l'autre membrane avec de l'anti-myc de souris (Invitrogen)
 Laver 4X15 min dans du PBST.
 Incuber 1h avec 5ml d'anticorps secondaire dilué 2000X dans du PBST/1%BSA.
 Incuber la première membrane avec de l'anticorps anti-lapin couplé à la HRP
 Incuber la seconde membrane avec de l'anticorps anti-souris couplé à la HRP
 Laver 4X15 min dans du PBST
 Révéler les membranes pendant 5 min dans 4 ml de substrat de la HRP (kit SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate, Pierce)
 Exposer les membranes avec un film ECL pendant 2 min

Matériel

<i>Z buffer:</i>	<i>Na₂HPO₄ 7H₂O</i>	<i>16,1 g/l</i>	<i>GTE :</i>	<i>50mM glucose</i>
	<i>NaH₂PO₄ H₂O</i>	<i>5,5 g/l</i>		<i>25mM Tris HCl pH8</i>
	<i>KCl</i>	<i>0,75 g/l</i>		<i>10mM EDTA</i>
	<i>MgSO₄ 7H₂O</i>	<i>0,246 g/l</i>		
	<i>Ajuster à pH7 et autoclaver</i>		<i>NaOH/SDS :</i>	<i>200µl NaOH 10N</i>
				<i>1ml SDS 10%</i>
				<i>eau jusqu'à 10ml</i>
<i>Buffer 1 (100 ml):</i>	<i>HEPES</i>	<i>2,38 g</i>		
	<i>NaCl</i>	<i>0,9 g</i>		
	<i>L-aspartate 0,065 g</i>		<i>KAc/Hac:</i>	<i>6ml Kac 5M</i>
	<i>(Hemi-Mg; Sigma #A-9506)</i>			<i>1,15ml HA</i>
	<i>BSA</i>	<i>1,0 g</i>		<i>2,25ml eau</i>
	<i>Tween 20</i>	<i>50 ml</i>		
	<i>Dissoudre dans 75 ml d'eau</i>		<i>PBST :</i>	<i>100ml PBS 10X</i>
	<i>Ajuster le pH à 7,25-7,3 et porter à 100 ml</i>			<i>2 ml tween20</i>
	<i>Filtrer</i>			<i>porter à 1ml avec eau</i>
<i>Buffer 2 (200 ml) :</i>	<i>Dissoudre 27,1 mg de CPRG dans 20 ml</i>		<i>YPD :</i>	<i>20g/l bacto peptone</i>
	<i>de buffer1.</i>			<i>10g/l yeast extract</i>
	<i>Stériliser par filtration</i>			<i>20g/l glucose</i>
				<i>10g/l agar (pour les boîtes)</i>
<i>Lysis buffer NP40 :</i>	<i>50 mM TrisHCl pH7,5</i>			
	<i>150 mM NaCl</i>			
	<i>1 % NP 40</i>			
	<i>porter à 200 ml avec eau</i>		<i>Lait :</i>	<i>2,5g lait en poudre Gloria</i>
				<i>50ml PBST</i>
ODB171 -> :	cgaggaattcgctcagaaacggacggcggtgc		ODB230 -> :	gtggaattctggaacagctgaagcaaaataaa
ODB231 -> :	cctgaattctcgctcagaaacggacggcggtgca		ODB181 -> :	ccagaattcacacaggggacgtggcagtg
ODB79 -> :	ccttagtgctcattccaagc		GAL4AD -> :	cggtctagtaaaattgatgatg
ODB82 -> :	cagtgtgtctgccacacc		R -> :	caggaaacagctatgac
ODB232 -> :	cctgaattcaagattggcagggccctccagattg		pACT25' -> :	ctattcgatgatgaagatacccca
ODB97 -> :	ccaagttctaattccatcagaagctgg		pACT23'bis -> :	gaaattgagatgggtgcacgatgc
ODB111 -> :	ctctgggaagcactgcg		GNAS5'Xba -> :	ggttctagaatgggtgactccgtccagattc
OB81 -> :	ctgtgcagtcagtcacg		GNAS3'Xba -> :	ggttctagagcagctcgtattggcggag
ODB90 -> :	tgactggactgcacagtc		GNAS1106 -> :	cagatgaggatcctgcattg
ODB173 -> :	ggtgaattcaactattgcaaatgatgagcag		GNAS1824 -> :	tcttcgatttgccagcaggagct
ODB233 -> :	tgaattctctctgacacaagcgagagtgggtgca		LRP15' -> :	tgaattctagattctgtgtataagcggcga
PCHO79 -> :	ttcttggtttgaccttgggccc		LRP13' -> :	agaattctatgccaaaggatctcctatctc
ODB224 -> :	cctaattctagatcaaaagaaagctctccgagc			
ODB234 -> :	cctgaattcgcagggcatcaaggactcgggtg			
PCHO96 -> :	cttggtgaagtacctgttggc			
PCHO82 -> :	ttctttgatgatgtccttcag			
ODB238 -> :	agtacctggactatgccaga		DNABD5' -> :	ggcttcagtgagactgata
ODB176 -> :	cctgaattcgacgtgtgattattagc		DNABD3' -> :	cgttttaaacctaagagtcac

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AD : Activation Domain
BD : Binding Domain
CIP : Calf Intestine alkaline Phosphatase
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CTL: Lymphocyte T Cytotoxique
Dlxn : Dlx interaction
DO : Densité Optique
HRP : Horse Raifort Peroxydase
IAP : Inhibitor of Apoptosis
Leu: leucine
LRP1: low density lipoprotein receptor-related protein 1
MAGE: Melanoma Antigen Encoding Gene
MCD: MAGE Conserved Domain
NRAGE : neurotrophin receptor interacting MAGE homolog
ON : overnight
ORF: Open Reading Frame (phase ouverte de lecture)
SD : Synthetic Dropout
TA: Température Ambiante
Trp : tryptophane

BIBLIOGRAPHIE

Andrieu, D., Watrin, F., Niinobe, M., Yoshikawa, K., Muscatelli, F. & Fernandez, P.A.

Expression of the Prader-Willi gene Necdin during mouse nervous system development correlates with neuronal differentiation and P75NTR expression. *Gene Expression Patterns* **3**, 761-765 (2003).

Barker, P.A. & Salehi, A.

The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. *J Neurosci Res* **67**, 705-712 (2002).

Bertrand, M., Huijbers, I., Chomez, P. & De Backer, O.

Comparative expression analysis of the maged genes during embryogenesis and brain development. *Developmental dynamics* **230**, 325-334 (2004).

Chomez, P., De Backer, O., Bertrand, M., De Plaen, E., Boon, T. & Lucas, S.

An overview of the MAGE family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res* **61**, 5544-5551 (2001).

De Backer, O., Verheyden, A.M., Martin, B., Godelaine, D., De Plaen, E., Brasseur, R., Avner, P. & Boon, T.

Structure, chromosomal location and expression pattern of three mouse genes homologous to the human MAGE genes. *Genomics* **28**, 74-83 (1995).

Dechant, G., Barde, Y.A.

The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci* **5**, 1131-1136 (2002).

De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J.J., Szikora, J.P., De Smet, C., Brasseur, F., van der Bruggen, P., Lethé, B., Lurquin, C., Brasseur, R., Chomez, P., De Backer, O., Cavenee, W. & Boon, T.

Structural, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* **40**, 360-369 (1994).

De Plaen, E., De Backer, O., Arnaud, D., Bonjean, B., Chomez, P., Martelange, V., Avner, P., Baldacci, P., Babinet, C., Hwang, S.Y., Knowles, B. & Boon, T.

A new family of mouse genes homologous to the human MAGE genes. *Genomics* **55**, 176-184 (1999).

De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F. & Boon, T.

The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7149-7153 (1996).

Gothardt, M., Trommsdorff, M., Nevitt, M.F., Shelton, J., Richardson, J.A., Stockinger, W., Nimpf, J. & Herz, J.

Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic

adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction. *J Biol Chem* **275**, 25616-24 (2000).

Jordan, B.W., D. Dinev, V. LeMellay, J. Troppmair, R. Gotz, L. Wixler, M. Sendtner, S. Ludwig & U.R. Rapp
Neurotrophin receptor-interacting mage homologue is an inductible inhibitor of apoptosis protein-interacting protein that augments cell death. *J Biol Chem* **276**, 39985-9 (2001).

Kuwako, K.I., H. Taniura, K. Yoshikawa
Necdin-related MAGE Proteins Differentially Interact with the E2F1 Transcription Factor and the p75 Neurotrophin Receptor. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 1703-1712 (2004).

Liu, J., S. Yu, D. Litman, W. Chen & L. S. Weinstein
Identification of a methylation imprint mark within the mouse Gnas locus. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 5808-5817 (2000).

Lucas, S., F. Brasseur & T. Boon
A new MAGE gene with ubiquitous expression does not code for known MAGE antigens recognized by T Cells. *Cancer Research* **59**, 4100-4103 (1999).

Lucas, S., E. De Plaen and T. Boon
Mage-B5, Mage-B6, Mage-C2, and Mage-C3: four new members of the MAGE family with tumor-specific expression. *Int J Cancer* **87**, 55-60 (2000).

Masuda, Y., A. Sasaki, H. Shibuya, N. Ueno, K. Ikeda and K. Watanabe
Dlxin-1, a novel protein that binds Dlx5 and regulates its transcriptional function. *J Biol Chem* **276**, 5531-8 (2001).

Matsuda, T., H. Suzuki, I. Oishi, S. Kani, Y. Kuroda, T. Komori, A. Sasaki, K. Watanabe, and Y. Minami
The receptor tyrosine kinase Ror2 associates with the MAGE-family protein Dlxin-1 and regulates its intracellular distribution. *J Biol Chem* **278**, 29057-29064 (2003).

Muscатели, F., D.N. Abrous, A. Massacrier, I. Boccaccio, M. Le Moal, P. Cau and H. Cremer
Disruption of the mouse Necdin gene results in hypothalamic and behavioural alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet* **9**, 3101-3110 (2000).

Österlund, C., V. Töhönen, K. Öhman Forslund; K. Nordqvist
Mage B4, a Novel Melanoma Antigen (MAGE) Gene Specifically Expressed during Germ Cell Differentiation. *Cancer Research* **60**, 1054-1061 (1999).

Peters, J., SF Wroe, CA Wells, HJ Miller, D. Bodle, CV Beechey, CM Williamson,

G. Kelsey

A cluster of oppositely imprinted transcripts at the *Gnas* locus in the distal imprinting region of mouse chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3830-3835 (1999).

Ross, A.H., Daou, M.C., McKinnon, C.A., Condon, P.J., Lachyankar, M.B., Kaplan, D.R. & Wolf, D.E.

The neurotrophin receptor, gp75, forms a complex with the receptor tyrosine kinase TrkA. *J Cell Biol* **132**, 945-953 (1996)

Roux P.P. and P.A. Barker

Neurotrophin signalling through the p75 neurotrophin receptor. *Progress in Neurobiology* **67**, 203-233 (2002).

Salehi, A.H., P.P. Roux, C.J. Kubu, C. Zeindler, A. Bhakar, L.L. Tannis, J.M. Verdi, and P.A. Barker

NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron* **27**, 279-288 (2000).

Salehi, A.H., S. Xanthoudakis and P.A. Barker

NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway. *J Biol Chem* **277**, 48043-50 (2002).

Sasaki A., Y. Masuda, K. Iwai, K. Ikeda and Ken Watanabe

A ring finger protein prajal regulates *Dlx5*-dependent transcription through its ubiquitin ligase activity for the *Dlx/Msx*-interacting MAGE/Necdin Family protein, *Dlxin-1*. *J Biol Chem* **277**, 22541-22546 (2002).

Smeijers L., S. Willems, A. Lauwers, E. Thiry, F. van Leuven, AJ Roebroek

Functional expression of murine LRP1 requires correction of *Lrp1* cDNA sequences. *Biochim Biophys Acta* **1577**, 155-158 (2002).

Taniura, H., Taniguchi, N., Hara, M. & Yoshikawa, K.

Necdin, a postmitotic neuron-specific growth suppressor, interacts with viral transforming proteins and cellular transcription factor E2F1. *J Biol Chem* **273**, 720-728 (1998).

Taniura, H., Matsumoto, K. & Yoshikawa, K.

Physical and functional interactions of neuronal growth suppressor Necdin with p53. *J Biol Chem* **274**, 16242-16248 (1999).

Tcherpakov, M., F.C. Bronfman, S.G. Conticello, A. Vaskovsky, Z. Levy, M.

Niinobe, K. Yoshikawa, E. Arenas, and M. Fainzilber

The p75 neurotrophin receptor interacts with multiple MAGE proteins. *J Biol Chem* **277**, 49101-49104 (2002).

W. Van Crielinge and R. Beyaert

Yeast Two-Hybrid : State of the Art. *Biological Procedures Online* **2** (1999)

van der Geer P.

Phosphorylation of LRP1 : regulation of transport and signal transduction. *Trends Cardiovasc Med* **12**, 160-165 (2002).

Wang X., JH Bauer, Y. Li, Z. Shao, FS Zetoune, E. Cattaneo, C. Vincenz
Characterization of a p75(NTR) apoptotic signalling pathway using a novel cellular model. *J Biol Chem* **276**, 33812-20 (2001).

Weinstein L. S., S. Yu, D.R. Warner and J. Liu

Endocrine manifestations of stimulatory G protein- α -subunit mutations and the role of genomic imprinting. *Endocrine Reviews* **22**, 675-705 (2001).

Weinstein L. S., S. Yu, C.A. Ecelbarger

Variable imprinting of the heterotrimeric G protein G_s α -subunit within different segments of the nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**, 507-514 (2000).

Wen C.J., B. Xue, W.X. Qin, M. Yu, M.Y Zhang, D.H. Zhao, X. Gao, J.R. Gu, C.J. Li
hNRAGE a human neurotrophin receptor interacting MAGE homologue, regulates p53 transcriptional activity and inhibits cell proliferation. *FEBS letters* **564**, 171-176 (2004).

Williams, M.E., P. Strickland, K. Watanabe and L. Hinck

UNC5H1 induces apoptosis via its juxtamembrane region through an interaction with NRAGE. *J Biol Chem* **278**, 17483-90 (2003).

Wroe S.F., G. Kelsey, J.A. Skinner, D. Bodle, S.T. Ball, C.V. Beechey, J. Peters and C.M. Williamson

An imprinted transcript, antisense to Nesp, adds complexity to the cluster of imprinted genes at the mouse Gnas locus. *PNAS* **97**, 3342-3346 (2000)